

# 小干扰 RNA 药物的化学修饰及递送系统\*

李琛 司笑 李金波\* 张艳\*

(南京大学生命科学分析化学国家重点实验室 江苏省先进有机材料重点实验室  
南京大学化学与生物医学创新中心 南京大学化学化工学院 南京 210023)

**摘要** 近十年来,核酸药物取得了迅猛发展,其中基于RNA干扰(RNAi)的技术成为一种多功能工具,并广泛应用于治疗各种疾病。小干扰RNA (siRNA)作为一种序列特异性的基因沉默方法,为研究基因功能和开发新的疾病治疗策略提供了有效且具有特异性的手段。因此,将 siRNA 应用于治疗中以靶向特定基因功能的方法引起了巨大的兴趣。然而,为了使RNAi技术具有价值和有效性,对 siRNA 进行化学修饰并开发出高效的 siRNA 递送策略至关重要。这些措施旨在改善 siRNA 的稳定性、细胞摄取能力、序列特异性,并减少非特异性的基因沉默以及毒副作用等生物活性。本综述简要介绍了 siRNA 的化学修饰,以提高其对核酸酶的抗性和稳定性。此外, siRNA 递送体系的开发也是重要的研究方向,包括脂质体和聚合物等载体系统,用于改善 siRNA 的药代动力学、增强细胞内递送和实现肿瘤靶向。最后,本综述总结和讨论了 siRNA 药物递送领域的技术瓶颈以及未来的发展趋势,为 siRNA 作为一种治疗策略的进一步应用提供了指导。

**关键词** RNA 干扰; 小干扰 RNA; siRNA 递送; 靶向递送; 化学修饰

## Chemical Modification and Delivery System of Small Interfering RNA Drugs\*

Li, Chen Si, Xiao Li, Jinbo\* Zhang, Yan\*

(State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Sciences, Jiangsu Key Laboratory of Advanced Organic Materials, Chemistry and Biomedicine Innovation Center (ChemBIC), School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

**Abstract** In the past decade, nucleic acid therapeutics have experienced rapid development, with RNA interference (RNAi) based technology emerging as a versatile tool widely used in the treatment of various diseases. Small interfering RNA (siRNA), as a sequence-specific gene silencing method, has provided an effective and specific means for studying gene function and developing new therapeutic strategies. Consequently, there has been significant interest in utilizing siRNA as a method to target specific gene functions in therapy. However, in order to make RNAi technology valuable and effective, it is crucial to chemically modify siRNA and develop efficient siRNA delivery strategies. These measures aim to improve the stability and cellular uptake capability of siRNA, enhance sequence specificity, and reduce non-specific gene silencing and biotoxicity. This review provides a concise introduction to the chemical modifications of siRNA aimed at enhancing its resistance to nucleases and stability. Additionally, the development of siRNA delivery systems, including lipid-based and polymer-based carrier systems, represents a significant research direction. These systems aim to improve the pharmacokinetics of siRNA, enhance intracellular delivery, and achieve tumor targeting. Finally, this review summarizes and discusses the technological bottlenecks and future trends in siRNA drug delivery, providing guidance for the further application of siRNA as a therapeutic strategy.

**Keywords** RNA interference; small interfering RNA; siRNA delivery; targeted delivery; chemical modifications

## 1 引言

1998 年, Fire 和 Mello 等<sup>[1]</sup>发表了一篇开创性论文,将双链 RNA (dsRNA)鉴定为秀丽隐杆线虫中转录后基因沉默(PTGS)的致病因子,他们将这种现象称为 RNA

干扰(RNAi)。RNAi 的发现解释了植物和真菌中令人费解的基因沉默的现象,引发了一场生物学革命并彻底改变了当时对基因调控的理解。它是一种自然发生的防御机制,可抵御外来核酸的入侵和基因表达的控制。RNAi 是双链 RNA (dsRNA)通过靶向互补的信使 RNA

\* Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

\* E-mail: jinboli@nju.edu.cn; njzy@nju.edu.cn

Received April 28, 2023; published July 14, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21977043, 22137003), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20202004) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. 020514380226, 020514380251).

\* 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受国家自然科学基金(Nos. 21977043, 22137003)、江苏省自然科学基金(No. BK20202004)、中央高校基本科研业务费(Nos. 020514380226, 020514380251)资助。

(mRNA)进行降解来诱导基因沉默的生物学机制,是一种在转录后水平实施的抑制基因表达的进化保守生物学过程. 因此, RNAi 是实验生物学和临床实践中抑制基因表达的一种非常方便的方法,是疾病治疗的巨大创新,并彻底改变了研究人员研究基因功能的方式<sup>[2]</sup>. 1999 年, Wingard 研究烟草植物对病毒的免疫反应时首次观察到小干扰 RNA (siRNA), 并且证明可以指导它们在哺乳动物细胞中调节的 mRNA 的序列依赖性核酸内切裂解<sup>[3]</sup>. siRNA 是一种双链非编码 RNA, 也称为短干扰 RNA<sup>[4]</sup>. 它们是外源性的, 具有由 19~23 个碱基对组成的有义(非指导)和反义(指导)链的短双链 RNA 序列, 具有磷酸化的 5'和羟基化的 3'末端以及每条链的 3'端突出的两个核苷酸, 可以靶向特定的 mRNA, 并使用 RNAi 现象将其裂解<sup>[2,5]</sup>. 2001 年, Elbashir 团队<sup>[6]</sup>将 RNAi 应用于人类疾病的治疗, 用实验证明了合成的 siRNA 可以限制一个基因在哺乳动物的不同细胞系中特异性表达的方式. 2004 年, 第一个以 siRNA 为基础的 RNA 药物(治疗湿性年龄相关性黄斑变性)进入 I 期临床试验<sup>[7]</sup>. 2010 年, 针对性应用于肿瘤患者的纳米颗粒输送系统进入 I 期临床试验, siRNA 开始系统性地应用于实体瘤<sup>[8]</sup>. 从此 siRNA 的研究进入全新的领域, 开始了快速发展的阶段.

不同于其他药物作用的 RNAi 机制, siRNA 诱导基因沉默的分子作用机制已被广泛研究(图 1)<sup>[9]</sup>. 简而言之, 化学合成的 siRNA 进入细胞内, 随后发生内体逃逸. 它被引入 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)中, 该复合物包含几种不同的蛋白质, 包括 Argonaute-2 (Ago-2)和 Dicer<sup>[10]</sup>. 通过移除其“有义”或“乘客”链激活 siRNA 后, 剩余的“反义”或“引导”链会引导 RISC 识别并结合互补靶 mRNA, 这导致随后的 mRNA 切割阻止它作为蛋白质合成的翻译模板<sup>[11]</sup>, 反过来, 这会导致效应基因的转录后沉默, 从而减少其目标蛋白的合成<sup>[12]</sup>. 研究表明 RISC 中位于 siRNA 引导链的 5'端的 Ago-2 介导切割<sup>[13]</sup>. 在目标 mRNA 被切割后, 它会被 P 小体中的细胞外切核酸酶降解<sup>[14]</sup>. siRNA 和 RISC 之间的相互作用, 以及随后的 mRNA 相互作用和切割由多种其他分子和过程促进, 这些分子间的相互作用实现特定的转录后基因沉默. 一旦确定了这种使用 siRNA 的序列特异性 RNAi 和基因沉默机制, 它就会迅速被用作沉默目标基因表达的工具, 并开发有效的治疗策略来应对多种疾病. 有趣的是, 经过 RISC 处理的 siRNA 可以循环使用, 它可以介导 mRNA 多轮切割, 沉默靶基因并降低其表达的能力<sup>[15]</sup>. RNAi 依赖于催化机制, 在目标 mRNA 裂解后, siRNA 负载的 RISC 能够解离并与另一个 mRNA 分子结合. 因此, 皮摩尔(pmol)浓度范围内的 siRNA 就能够诱导有效的基因敲低, 每个细胞内少于 2000 个 siRNA 就足够实现 RNAi 效果<sup>[16]</sup>. 该机制还应与 microRNAs (miRNAs)区分开来, 后者仅部分互补, 而 siRNA 作用依赖于 100%的互补. siRNAs 在 mRNA 水平

上发挥转录后作用, 而不是在蛋白质上发挥翻译后作用, 这使其可以抑制那些没有抑制剂可用或被称为“无成药性”蛋白质的基因<sup>[17]</sup>, 从而极大地扩展了潜在靶点的范围, 而不仅仅是一小部分可靶向的蛋白质<sup>[18]</sup>. 因此, 直接应用 siRNA 的 RNAi 为创新疗法开辟了新途径.

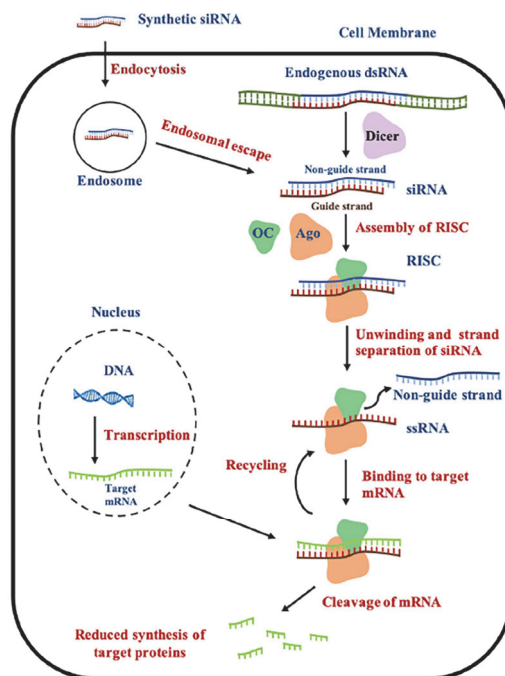


图 1 siRNA 分子机制<sup>[9]</sup>  
Figure 1 The mechanism of siRNA<sup>[9]</sup>

siRNA 正在成为一种新的治疗药物类别. 在 2018 年 8 月, FDA 批准了第一个 siRNA 疗法, 称为 ONPATRO™ (Patisiran), 用于治疗转甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性. 这是 siRNA 药物递送领域的一个重要里程碑, 为其他 siRNA 药物开辟了道路. 截止 2023 年 3 月, 全球在研 siRNA 药物总计 225 个, 临床阶段在研品种共计 58 个. 其中, 临床 III 期品种 8 个、临床 II 期品种 23 个、临床 I 期品种 26 个、临床申请品种 1 个. 本文将介绍 siRNA 药物的分子机制及其优缺点, 并探讨克服 siRNA 药物在 RNAi 治疗中的局限性方面的技术进步. 因此, 本综述的重点是介绍 siRNA 的化学修饰, 以改善核酸酶抗性, 并通过 siRNA 递送系统改善 siRNA 药代动力学、增强细胞内递送和肿瘤靶向性. 最后, 我们讨论了 siRNA 药物在癌症治疗临床转化中的未来前景和挑战. 本综述将通过探索基础生物学、化学、最新进展和临床发展, 并考虑潜在的局限性和持续的挑战, 重点关注非传染性疾病, 全面描述 siRNA 药物的应用.

## 2 siRNA 药物的优势与局限

siRNA 药物具有许多优势. 首先, 它们能够潜在地靶向几乎任何感兴趣的单个基因或蛋白质的表达, 解决了传统小分子方法可能无法治愈的目标. 例如, 据估计

只有20%的蛋白质组可以被常用药物靶向<sup>[19]</sup>。一旦了解目标基因序列,就可以开发匹配的 siRNA,并快速优化和制造先导化合物。目前,定制裸露的 siRNA 以开发具有合适药理学特征的治疗剂已成为可能。与作用于蛋白质水平靶标(例如受体、酶和通道)的小分子药物相比, siRNA 药物具有明显的优势。前者需要复杂的开发过程以确保选择性和合适的药理学。此外,虽然进入细胞逃脱内体后进入细胞质的 siRNA 只占1%~2%,但一旦与 RISC 结合,它就不会被核酸酶降解,从而延长作用时间<sup>[20]</sup>。已获批准的 siRNA 药物(例如 Inclisiran)在单次皮下给药后的效果可以持续至少6个月<sup>[21]</sup>。对于需要定期用药的慢性病治疗,这是一个明显的优势,并且有望显著提高患者的服药依从性,从而更好地控制疾病。此外,基于 siRNA 的疗法具有高度的选择性,尽管某些基于蛋白质的药物(例如抗体)也具有类似的选择性,但它们的合成和制造成本更高,这使基于 siRNA 的疗法具有明显的优势<sup>[22]</sup>。另一个重要的优势是 siRNA 不会永久改变基因组,这对于安全性考虑至关重要。某些基因突变会导致癌症,在初始阶段对传统化学疗法敏感,但随着时间的推移会产生耐受性。与此不同, siRNA 可以停止治疗和控制,而不会永久改变基因组,这是一个重要的安全性考虑因素(图2)<sup>[23]</sup>。此外, siRNA 为目前缺乏有效疗法的罕见疾病提供了机会,这一点从它们在遗传疾病治疗中的早期取得的成功中可以明显看出。



图2 siRNA 药物在临床广泛应用的利与弊

Figure 2 The advantages and disadvantages of widespread application of siRNA in clinic

RNAi 和反义寡核苷酸是迄今为止使用最广泛的两种基因沉默治疗方法。反义寡核苷酸是合成的单链分子(由8~50个核苷酸组成),通过与特定 mRNA 的互补碱基配对结合。它们可以通过碱基配对和 RNase H 的作用切割特定 mRNA,或者简单地通过占据目标 mRNA 并阻断其与 RNA 结合蛋白的相互作用来阻止 mRNA 的翻译,从而实现转录后的基因沉默<sup>[24]</sup>。作为单链分子,反义寡核苷酸不如 siRNA 稳定<sup>[25]</sup>。此外,由于反义寡核苷酸与靶向 mRNA 结合后可能增加前体 mRNA 的转录和产生,因此某些情况下会出现对特定反义寡核苷酸的

耐受性。这缩短了它们的活性持续时间,需要更频繁的给药<sup>[26]</sup>。

近年来, siRNA 药物受到了越来越多的关注,得益于 siRNA 所表现出的一系列优势,并且相关研究也日益增多。然而,如何安全有效地将 siRNA 递送到患病部位(包括肝脏以外的生物分布)仍然是一个重大挑战<sup>[27]</sup>。限制 siRNA 进入临床应用的主要困难是其给药方式,包括 siRNA 分子稳定性差、体内分布广泛、细胞摄取困难、靶向性差,并受到多种生物屏障的影响<sup>[28]</sup>。静脉内给药后,核酸酶的降解会导致 siRNA 的半衰期缩短(<10 min)。核酸的物理化学特性,如高分子量、亲水性和负电荷,会阻碍其通过生物膜的吸收。其他障碍还包括非特异性组织分布、细胞内运输不良、高肾脏清除率以及脱靶效应。在细胞水平上,内体逃逸对 siRNA 的活性至关重要,并且仍然是 siRNA 疗法的主要挑战之一<sup>[29]</sup>。此外, siRNA 的双链骨架结构中带有负电荷的亲水磷酸基团使得细胞膜难以吸收裸露的 siRNA。因此, siRNA 需要通过载体的帮助进行化学修饰或递送。为了克服基因治疗临床转化的这些障碍,需要对智能、有效和安全的递送系统的设计和评估进行广泛的研究<sup>[30]</sup>。

### 3 siRNA 的化学改性

为了增强 siRNA 功能并改善 siRNA 其他的特性,已经开发了多种核苷酸修饰方法,并将其应用于 siRNA 的设计中。化学修饰对于 siRNA 在体内的使用非常重要,因为它可以影响 siRNA 的特性,如对核糖核酸酶的敏感性、RNAi 系统的识别、疏水性、毒性、双链解链温度以及 RNA 螺旋的构象<sup>[31]</sup>。作为 RNA 的基本组成部分,天然核苷酸通常由核糖、1'-核碱基和 3'-磷酸基组成。根据 RNA 的结构,可以分为磷酸修饰、碱基修饰和核糖修饰(图3)。

#### 3.1 磷酸修饰

内源性 siRNA 包含已知的 RNA 结构,其中核糖环在 1'位与碱基结合,并通过 3'和 5'位之间的磷酸二酯键连接。未修饰的 siRNA 的核苷酸间磷酸二酯键带有负电荷,容易被核酸酶切割<sup>[32]</sup>。研究表明,使用硫代磷酸酯(PS)或硼酸磷酸酯(BP)连接取代这些磷酸二酯连接可以在体外和体内保护 siRNA 免受核糖核酸酶的降解,并增强 siRNA 的体内效力<sup>[33]</sup>。特别是在末端核苷酸之间进行修饰时,它们可以防止 3'和 5'核酸外切酶的降解作用<sup>[34]</sup>。

最常见的改善 siRNA 核酸酶抗性和药代动力学特性的主链修饰是 PS 连接<sup>[33a,35]</sup>。适度的 PS 修饰在 siRNA 双链体的末端具有良好的耐受性,并可延长基因沉默的持续时间<sup>[36]</sup>,而过度的 PS 修饰可能导致毒副作用<sup>[36b,37]</sup>。因此,在 siRNA 的临床应用中,PS 修饰的数量应控制在5%~50%的范围内,具体取决于预期的 siRNA 剂量。



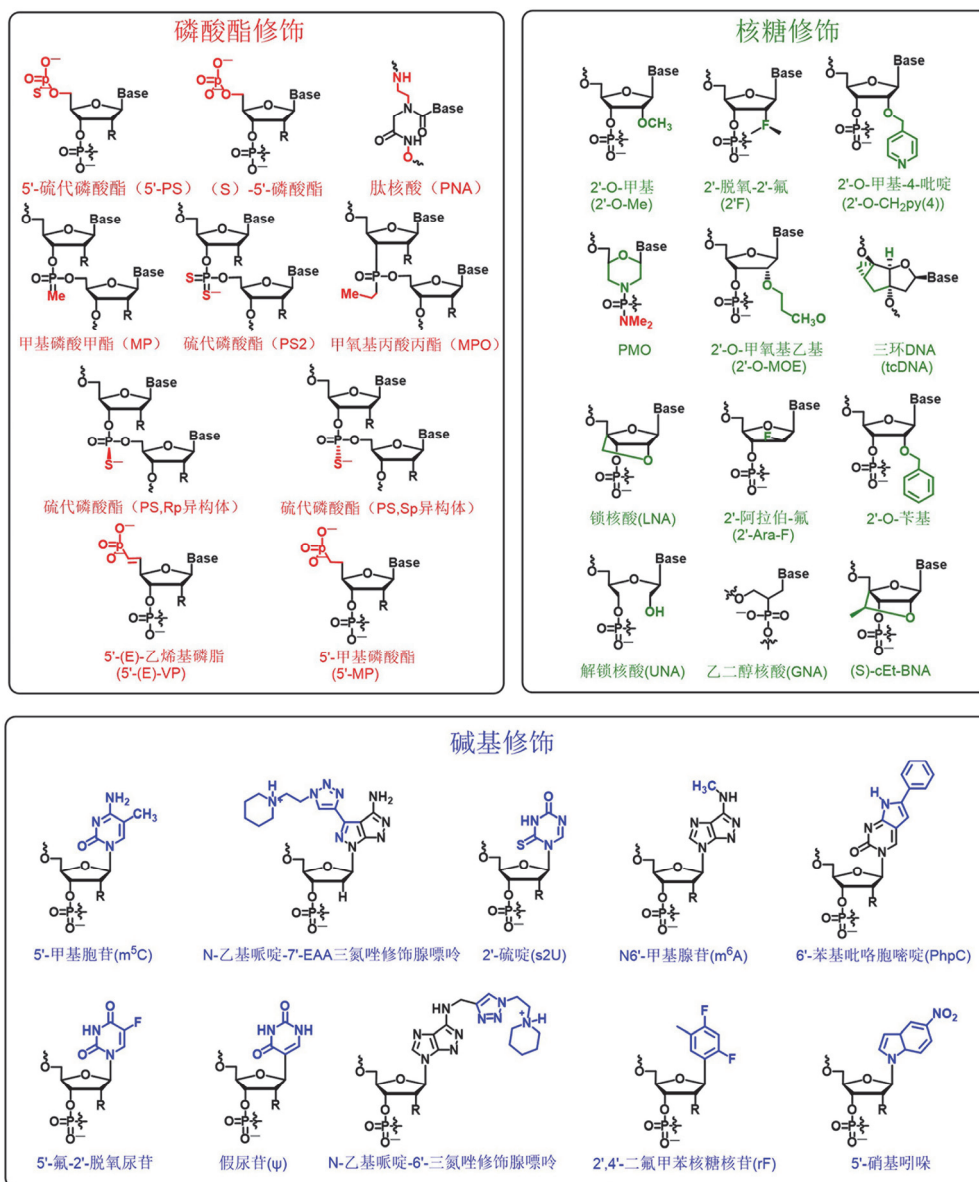


图3 siRNA的化学修饰主要分为三类:磷酸骨架修饰、核糖修饰和碱基修饰

Figure 3 The chemical modifications of siRNA are mainly divided into three categories: phosphate skeleton modification, ribose modification and base modification

与PS修饰不同,将BP引入反义链的中心部分会强烈抑制RNAi作用。具有BP连接的siRNA是功能性的,并且根据Hall等<sup>[38]</sup>的研究,相对于天然siRNA和PS修饰的siRNA,BP修饰的siRNA表现出更高的效力,BP修饰的siRNA能够有效保护siRNA免受核酸酶的影响,其保护效果大约是前两者的两倍。如果这样的修饰方法可以实现,它可能解决siRNA在生物医学应用中的一些问题。然而,使用BP进行siRNA修饰的主要限制之一是缺乏大规模合成BP修饰的siRNA的优化方法。因此,需要开发新的方法来评估BP修饰的siRNA在体内的治疗潜力。

引入酰胺键以取代磷酸二酯键的修饰有助于保护siRNA免受核酸酶的降解作用,但它们对RNAi效率的

影响尚不确定<sup>[39]</sup>。虽然磷酸二酯键被替代,但在核苷酸10、11和12之间引入酰胺键可以增强修饰的siRNA的抑制作用<sup>[40]</sup>。

除上述修饰以外,二硫代磷酸酯单独或与2'-OMe组合被用于siRNA以增加核酸酶抗性和沉默效力,但尚未广泛应用<sup>[41]</sup>。磷酰基乙酸酯和硫代磷酰基乙酸酯键也被引入到siRNA的过客链中,但并未提高siRNA的沉默活性或细胞摄取<sup>[42]</sup>。

### 3.2 核糖修饰

在所有核糖修饰中,2'位的核糖修饰(图3)是最常见且广泛用于保护siRNA免受核糖核酸酶攻击的修饰,因为2'-OH基团参与核糖核酸内切酶对RNA的切割<sup>[43]</sup>。由于2'-OH基团对于酶促水解是必需的,但对于RNA

活性不是必需的, 因此可以用 2'-O-甲基(2'-O-Me; 一种天然核糖)取代它. 2'-O-Me 是最常用的 siRNA 修饰方法<sup>[44]</sup>, 它不仅增加了 siRNA 的稳定性和半衰期, 还显著增加了 siRNA 对靶 mRNA 的亲合力, 同时降低免疫原性<sup>[45]</sup>. 这些特性使得 siRNA 的 2'-O-Me 修饰成为将基于 siRNA 的药物引入临床的最具吸引力的策略之一<sup>[46]</sup>. 由于修饰的大小可能有助于增加 siRNA 的核酸酶抗性, 因此还尝试在核糖的 2'位置引入更多的取代基, 例如 2'-O-甲氧乙基(2'-O-MOE)<sup>[47]</sup>, 2'-O-烯丙基<sup>[36b]</sup>以及 2'-O-苄基<sup>[48]</sup>. 研究表明, 这些取代基相较于 2'-O-Me 能更显著地抑制 RNAi.

用高电负性氟取代 2'-OH 基团的 2'-氟(2'-F)修饰广泛用于临床和临床前使用的 siRNA. 与 2'-OH 基团中氢的取代不同, 氧被 2'-F 取代更符合 RNA 的原始结构, 有效地稳定了 3'内切核糖构象<sup>[49]</sup>. 将 2'-F 引入双链体的所有核苷酸只会略微降低 RNAi 的效率<sup>[50]</sup>, 这种修饰保护 siRNA 在体外和体内免受核酸酶的作用<sup>[51]</sup>. 除此之外, 核糖的修饰包括解锁核酸(UNA)、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)、受限 5-甲基尿嘧啶核苷(5)-cEt-BNA、三环-DNA 和二氨基磷酸酯吗啉代低聚物等. UNA 和 GNA 均作为热不稳定核苷酸, 通过阻断过客链的进入和促进引导链的 RISC 加载来最大限度地减少脱靶效应, 从而将化学不对称性引入双链 siRNA. 这里要着重提到的核糖修饰是 LNA, 即锁定在 RNA 模拟糖构象中的双环呋喃糖单元. LNA 通过将核糖“锁定”到其首选的 C3'-内构象中, 显著增加了碱基配对的亲和力<sup>[52]</sup>.

### 3.3 碱基修饰

siRNA 与 mRNA 通过碱基互补形成氢键, 从而发挥 RNAi 的作用. 为了增强碱基之间的相互作用, 可以对碱基进行修饰. 这些修饰包括用 5'-溴尿嘧啶、假尿嘧啶、2'-硫尿嘧啶、5'-碘尿嘧啶、二氢尿嘧啶和次黄嘌呤取代核苷酸碱基, 通过增强体外互补核苷酸之间氢键的形成来提高热稳定性<sup>[53]</sup>. 研究证明, 少量的碱基修饰

( $\leq 10\%$ )可以最大限度地减少对免疫系统的刺激并增强体外的热稳定性<sup>[54]</sup>. 这些碱基修饰在 siRNA 的化学修饰模式中的存在有助于优化 siRNA 的治疗特性, 但目前碱基修饰在治疗性 siRNA 的开发中尚未得到广泛应用.

siRNA 核苷酸的化学修饰和类似物的使用为 siRNA 疗法的开发提供了解决许多挑战的方案. 研究表明, 多种化学修饰可以增强天然 siRNA 的稳定性和功效. 大多数成功的治疗性 siRNA 通常采用组合的化学修饰, 以实现最适合临床使用的药理特性. 尽管未经修饰或略微修饰的 siRNA 能够在体内介导基因沉默(特别是在局部应用的组织中), 但广泛的修饰可以实现以下目标: (1)有效抑制免疫刺激和 siRNA 诱导的先天免疫反应激活; (2)提高化学稳定性和功效; (3)减少脱靶引起的毒性<sup>[52,55]</sup>. 此外, 有人提出化学稳定的 siRNA 在细胞内酸性区域(例如溶酶体)中的半衰期增加, 有助于延长其持续作用时间, 从而实现连续 RISC 加载和目标基因沉默的延长<sup>[56]</sup>.

## 4 siRNA 递送系统

尽管化学修饰策略在一定程度上有助于提高 siRNA 疗法的稳定性和降低免疫原性, 但递送问题仍然是实现稳健、安全和高效 siRNA 药物应用的主要障碍<sup>[57]</sup>. 目前存在两种与临床相关的递送方法: 病毒和非病毒递送系统(参见图 4)<sup>[9]</sup>. 基于病毒的 siRNA 递送系统利用一系列病毒载体, 如逆转录病毒、慢病毒和腺病毒, 具有高靶细胞转染效率的优势<sup>[58]</sup>. 然而, 它们的有效性和临床实用性受到预先存在的宿主对病毒载体的免疫反应的限制<sup>[59]</sup>, 可能引发宿主免疫反应(导致后续给药期间失去疗效)和不良反应<sup>[60]</sup>, 并且可能涉及到不必要的宿主基因组插入以及生产用于人类的安全载体所带来的高成本问题<sup>[61]</sup>. 虽然基于病毒的策略非常有效, 但由于存在这些限制, 当前更多的关注集中在非病毒递送系统上<sup>[62]</sup>. 总体而言, 非病毒递送载体易于扩大

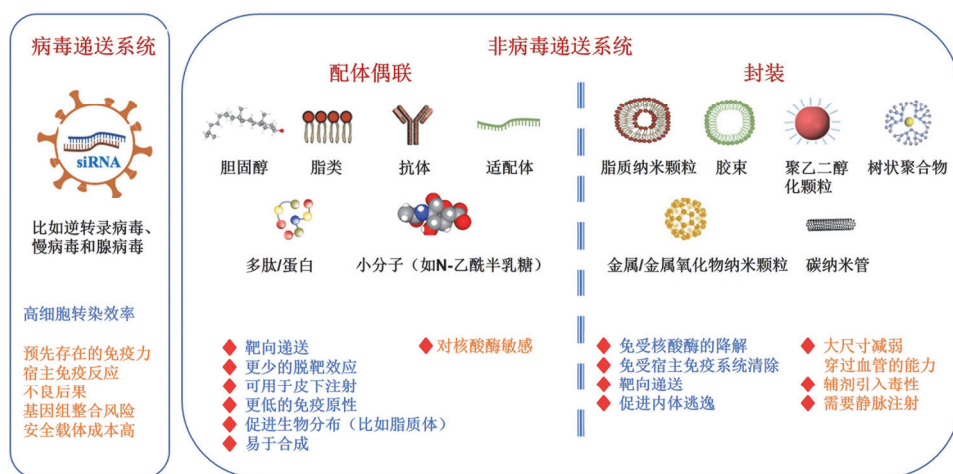


图 4 小干扰 RNA 递送系统及其优缺点(蓝色文本: 优点; 橙色文本: 缺点)

Figure 4 siRNA delivery strategies, as well as their advantages and disadvantages (blue text: advantages; orange text: disadvantages)

应用, 并且能够解决病毒载体的许多限制, 尤其是安全性方面<sup>[62a,63]</sup>. 科学家已经设计了一系列生物相容性材料, 用于复合、封装和递送治疗性核酸, 具有不同程度的有效性<sup>[64]</sup>.

#### 4.1 基于脂质的 siRNA 递送

脂质体是用于 siRNA 递送的非常有吸引力的非病毒载体之一<sup>[65]</sup>. 它们已被广泛应用于封装小分子药物, 例如用于治疗乳腺癌的 Doxil 和用于治疗真菌感染的 AmBisome<sup>[66]</sup>. 常见的基于脂质的递送系统包括脂质体、固体脂质纳米颗粒、胶束和乳液<sup>[67]</sup>. siRNA 可以通过与带正电荷的脂质体形成静电相互作用而被包封在脂质复合物中<sup>[68]</sup>.

脂质纳米颗粒(LNPs)被认为是无毒、生物相容的, 并且通常使用生理脂质进行配制<sup>[69]</sup>, 因此它们被认为是最先进的全身递送平台<sup>[70]</sup>. FDA 批准的 LNPs 包含四种基本成分的变体: 阳离子或可电离脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇(PEG)-脂质(图 5). LNPs 的物理特性(如大小、表面电荷分布)和化学特性(如脂质类型、组成、氮/磷酸(N/P)物质的量比和 RNA 封装效率)可以控制整体的生物分布和治疗效果. 因此, 需要优化 LNPs 的上述特性以达到最佳化治疗效果<sup>[71]</sup>. 研究人员利用不同的化学反应(如迈克尔加成反应、点击化学等)构建了多种化学性质不同的脂质递送系统<sup>[72]</sup>, 因为脂质结构会影响递送. 经过优化的脂质递送系统显著降低了药物的使用剂量, 并提高了其安全性<sup>[73]</sup>. 使用 LNPs 作为载体可以增强其物理稳定性和降低毒性<sup>[74]</sup>, 并且显著提高

细胞内摄取和 siRNA 的逃逸能力. 此外, LNPs 可以进行大规模生产, 这有助于进行临床试验并满足商业需求<sup>[75]</sup>. 在整个制药行业, LNPs 正迅速成为一种有前途的载体, 可以用于递送多种治疗药物.

固体脂质纳米颗粒(SLN)是另一种类似于 LNPs 的载体, 用于研究治疗肝脏相关疾病<sup>[77]</sup>和癌症<sup>[78]</sup>的 RNA 双链体制剂. SLN 具有一个疏水性脂质核心和脂质膜涂层<sup>[79a]</sup>. 通过使用一种称为“疏水离子对(HIP)方法”的技术, 在 RNA 双链体和阳离子脂质之间形成离子复合物, 将 siRNA 掺入到中性疏水性 SLN 核心中<sup>[80]</sup>. 在 2019 年的研究中, O'Mary 等<sup>[81]</sup>发现, 将一种抗炎皮质类固醇倍他米松与靶向肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的 siRNA 共同掺入到 SLN 的疏水核心中, 可以抑制体内促炎细胞因子的诱导, 例如白细胞介素-6 和单核细胞趋化蛋白-1. 通过优化核心脂质和表面脂质的比例, 可以控制外膜的数量, 从而有助于控制 siRNA 的持续释放.

除此之外, 越来越多的类似脂质体的化合物和衍生物正在不断开发中, 这可能有助于 siRNA 或其他类型的 RNA 治疗<sup>[66,82]</sup>. 尽管基于脂质的系统已经显示出递送 siRNA 的潜力, 但一些数据表明, 脂质-siRNA 药物制剂可能会引发未鉴定的干扰素反应, 因此需要采取适当的解决方案<sup>[83]</sup>. 干扰素反应是机体对病毒感染的一种天然免疫反应, 但如果出现在脂质-siRNA 治疗中, 可能会干扰治疗效果. 在这方面, 有进一步的研究需要解决这个问题, 以确保脂质-siRNA 制剂的安全性和有效性.

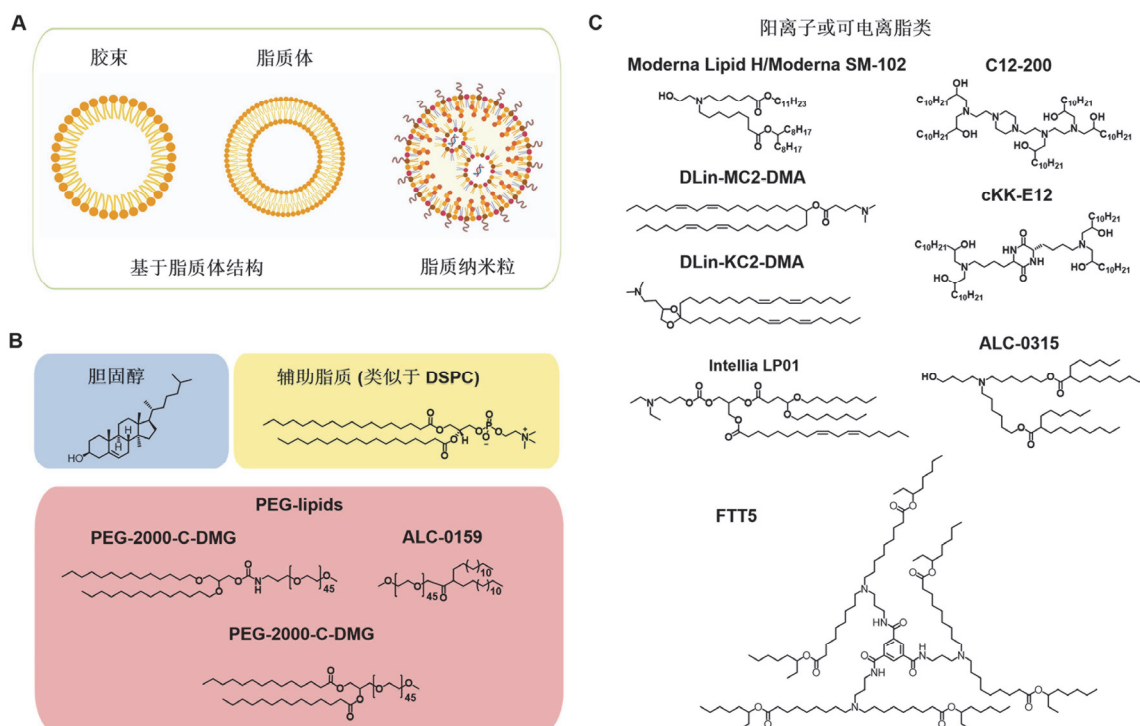


图 5 FDA 批准的基于脂质的结构所包含的四种基本成分<sup>[76]</sup>

Figure 5 FDA-approved lipid-based structures contain the four basic components<sup>[76]</sup>



## 4.2 聚合物介导的 siRNA 递送

基于聚合物的递送系统已经广泛应用于质粒 DNA, 并且许多非病毒 RNA 递送系统也使用聚合物和聚合物纳米颗粒<sup>[84]</sup>. 与基于脂质的递送系统类似, siRNA 的聚合递送系统通常涉及阳离子部分作为核心成分. 自 1990 年以来, 用于递送质粒 DNA 的阳离子聚合物的研发已经取得了广泛的研究和进展. siRNA 在分子量、电荷比、稳定性和作用方式方面与质粒 DNA 存在差异. 然而, 由于两者都是核酸, siRNA 和质粒 DNA 具有许多与体内递送类似的特征. 因此, 聚合物介导的 DNA 递送系统将为开发基于聚合物的 siRNA 疗法提供大量相关信息<sup>[85]</sup>.

siRNA 与聚合物的直接偶联为改善其稳定性、药代动力学、细胞摄取和递送提供了一个强有力的途径. 在基于聚合物的递送中, siRNA 被包裹在不同种类的阳离子聚合物中, 例如壳聚糖、环糊精、聚乙烯亚胺(PEI)等, 这些聚合物可以形成纳米颗粒, 并可以表面装饰有聚乙二醇(PEG)和靶向基团, 用于实现纳米颗粒的稳定性、细胞摄取和靶向递送(图 6).

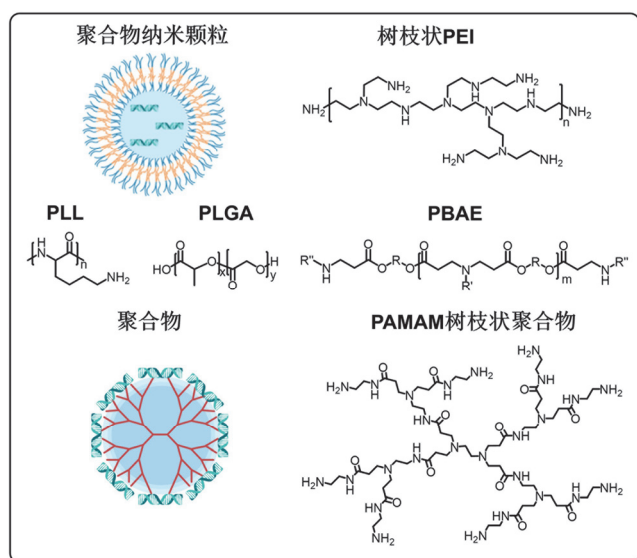


图 6 siRNA 递送常用的聚合物体系  
Figure 6 Common polymer systems for siRNA delivery

壳聚糖是目前研究最广泛的非病毒、天然衍生的聚合基因递送载体之一. 它由  $\beta$ -(1-4)-连接的 D-氨基葡萄糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖单元组成, 具有阳离子多糖的特性. 由于其阳离子特性, 壳聚糖及其衍生物已被广泛研究用于体外和体内递送质粒 DNA 和 siRNA<sup>[86]</sup>. 研究表明, 利用壳聚糖涂层的聚异己基氰基丙烯酸酯纳米颗粒可有效递送特异性 siRNA, 抑制小鼠侵袭性异种移植乳腺癌的生长<sup>[87]</sup>. 此外, 自组装的  $\alpha$ -维生素 E 寡壳聚糖纳米颗粒也已经开发用于递送针对 MCL1 的 siRNA<sup>[87]</sup>.

环糊精是一种天然高分子聚合物, 能够与小分子形

成水溶性的包合物<sup>[88]</sup>. Lieskovan 等<sup>[79b]</sup>开发了一种含环糊精的聚阳离子系统, 用于靶向递送 siRNA. 该系统由含有环糊精的聚合物、用于稳定的 PEG 和作为靶向配体的人转铁蛋白组成, 用于与过度表达的转铁蛋白受体结合. 这种靶向纳米颗粒系统被称为 CALLA-01, 由 Calando Pharmaceuticals (Pasadena, CA, USA)开发, 用于首个 siRNA 的临床 I 期试验<sup>[78]</sup>.

聚乙烯亚胺(PEI)是一种常用的阳离子聚合物, 广泛用于递送抗癌 siRNA<sup>[89]</sup>. PEI 以各种分子量的支链 PEI 以支链或线性形式存在, 具有不同的分子量. 由于其高阳离子电荷密度, PEI 可以与核酸形成小而致密的纳米颗粒, 在体外和体内递送 siRNA 后实现靶基因的沉默. PEI 与 HER-2 受体特异性 siRNA 的复合物已显示出在小鼠体内产生基因沉默并展现抗肿瘤效果<sup>[90]</sup>. 据报道, 将 PEI 与脂质连接可以改善 PEI 在 siRNA 递送方面的功能<sup>[91]</sup>.

树枝状聚合物是一种合成的高度支化大分子, 具有三维纳米结构, 其独特结构增加了其作为药物载体的潜力<sup>[92]</sup>. 阳离子树突状大分子已被证明在 siRNA 的体内传递中能够长时间掩蔽其电荷. 聚阳离子树枝状聚合物已被应用于非病毒 siRNA 递送载体中. 在这种方法中, 聚阳离子树枝状聚合物与具有靶向功能的脂质部分结合, 并与 2'-修饰的 siRNA 形成复合物. 近年来, 研究人员对聚阳离子树枝状聚合物, 如聚酰胺-胺(PAMAM)和聚丙基亚胺(PPI)树枝状聚合物在 siRNA 递送中的应用进行了研究. PAMAM 树枝状聚合物已成为最常用的基于树枝状聚合物的基因传递载体. 然而, PAMAM 具有细胞毒性, 主要与细胞凋亡相关的线粒体功能障碍有关<sup>[92]</sup>. 通过进一步的修饰, 可以降低其细胞毒性. 例如, 经过表面改性的阳离子 PAMAM 树枝状聚合物表现出非常低的细胞毒性, 并且即使在高浓度下, 它们在体外仍能有效穿透癌细胞<sup>[93]</sup>. PPI 树枝状聚合物也被用于制备 siRNA 纳米颗粒, 并且这些纳米颗粒显示出有效的基因沉默效果<sup>[88]</sup>.

与 LNPs 类似, 聚合物具有正电荷可以实现内体逃逸并改善细胞摄取. 使用简单、可生物降解的、具有靶向的聚合物设计聚合物平台可能是当前科学家的潜在目标.

## 4.3 siRNA 的偶联和靶向递送

在非病毒载体介导的 siRNA 递送中, 脂质和聚合物发挥了重要作用, 并取得了显著进展. 然而, 这些方法仍需应对免疫反应、非特异性靶向和粒径控制等问题. 另一种体内 siRNA 递送的策略是直接将 siRNA 与特定配体(如靶向分子或增强剂)结合. 此外, 由于结合策略使 siRNA 本身成为单一一体化治疗药物, 因此从制造和监管的角度来看, 尽管大规模生产的成本和反应收率仍有待提高, 但这种方法将是有效的<sup>[93]</sup>. 使用与特定细胞受体结合的配体能够精确递送 siRNA 分子到特定的体

内靶细胞/组织, 靶向递送有助于最大限度地减少脱靶效应, 并且由于它们的分子尺寸较小, 大多数生物偶联物本质上具有较低的免疫原性. 通过将 siRNA 与聚合物、肽、抗体、适体等偶联, 已经开发出许多偶联物递送系统, 以提高稳定性、延长循环时间并促进在体内给药时的细胞摄取(图 7)<sup>[94]</sup>. siRNA 偶联物减少了对额外递送材料的需求, 从而可以提高递送制剂的耐受性和安全性<sup>[95]</sup>.

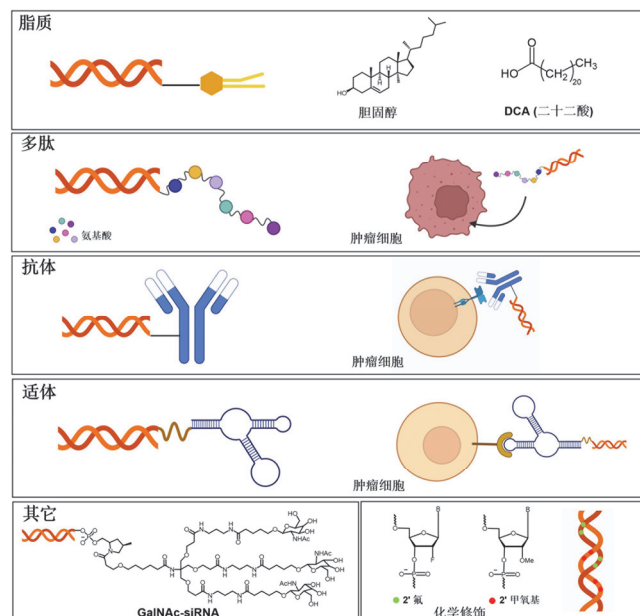


图 7 siRNA 生物偶联物示意图  
Figure 7 Schematic diagram of siRNA bioconjugates

siRNA 与细胞表面受体配体的偶联物已经显示出作为靶向药物递送的有前途途径. 这些受体仅在特定细胞类型中表达, 并且在某些与疾病相关的特定器官或组织中过度表达. 其中一个成功的临床案例是糖蛋白 *N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc), GalNAc 是一种碳水化合物衍生的三价配体, 可结合到去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR). ASGPR 在肝细胞上高度表达, 在其他细胞类型上不表达, 与 GalNAc 结合后引发快速内吞作用, 并在内吞后快速回收细胞表面. GalNAc 的分子量小于 2 kDa, 远小于递送的 siRNA 的分子量, 这确保大部分给药物质是 siRNA 而不是 GalNAc. Nair 等<sup>[96]</sup>首次证明 GalNAc-siRNA 在体外和体内(小鼠)促进了 siRNA 的靶向传递到肝细胞. 这项技术的发展极大地推动了 siRNA 疗法的进展, 使其能够用于全身递送到肝脏中合成的蛋白质的靶向治疗.

在 siRNA 递送中, 除了 GalNAc 外, 还有其他类似的配体正在开发中. 例如, 胰高血糖素样肽-1 可用于靶向胰腺  $\beta$  细胞, 转铁蛋白受体蛋白-1 可用于靶向骨骼肌/心肌, 叶酸可用于靶向癌细胞受体<sup>[97]</sup>. 脂质和胆固醇结合物有助于 siRNA 与细胞膜相互作用, 并通过与低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)颗粒形成复合物

来促进生物分布<sup>[98]</sup>. 体内研究表明, 胆固醇偶联物比其他亲脂性物质更高效地在肝脏、肾上腺和脾脏中保留, 并具有有效的生物蓄积性<sup>[99]</sup>. 此外, 与适体(合成寡核苷酸)结合可能具有穿透血脑屏障的额外优势. 然而, 这些方法目前在临床应用中受到限制, 因为它们对核酸酶、肾脏清除和免疫原性具有敏感性<sup>[100]</sup>. 抗体-siRNA 偶联物也可以用于靶向特定细胞受体抗原, 与其他类似配体相比具有更高的结合效率. 然而, 这些偶联物需要克服免疫原性和低内体逃逸的限制<sup>[12]</sup>. 总的来说, 具有靶向递送和低毒性的 siRNA 与配体的偶联物提供了一种成功的治疗策略. 然而, 某些偶联分子仍需要进一步优化以提高临床应用效果. 总结起来, 随着 GalNAc-siRNA 偶联物成为真正的药物, 清楚地表明 RNAi 治疗领域正在从大型 LNP 转向小型靶向 siRNA 偶联物.

#### 4.4 无机纳米粒子

由于其优越的物理化学特性、生物利用度、血清稳定性以及降低的细胞毒性和在靶标附近的释放能力, 许多无机纳米颗粒已成为设计用于治疗目的的潜在 siRNA 递送系统. 其中包括量子点(QD)、碳纳米管(CNT)和金纳米粒子(Au NPs). 研究人员对这些纳米颗粒的摄取和释放机制进行了探索和研究(图 8).

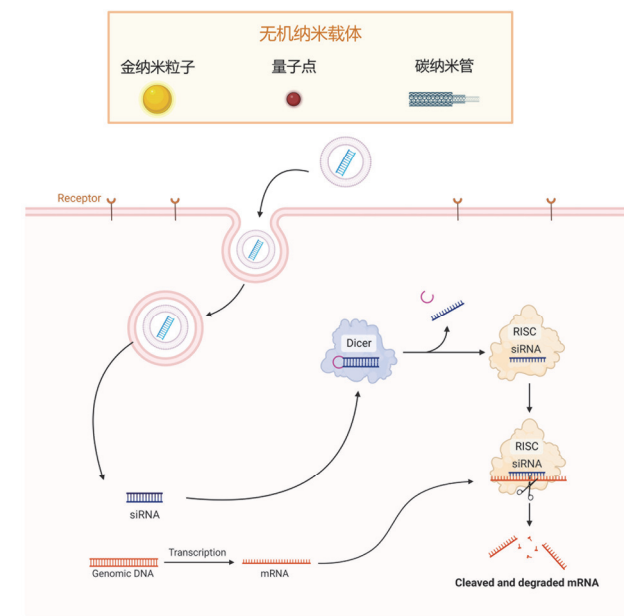


图 8 载有 siRNA 的无机纳米载体的细胞摄取和释放机制  
Figure 8 The cellular uptake and release mechanisms of siRNA-loaded inorganic nanocarriers

QD 是半导体无机晶体, 具有改进的光稳定性和能够改变光学特性以实现多种非重叠颜色的能力<sup>[101]</sup>. QD 已成为癌症靶向、活体动物成像和肿瘤组织病理生理学研究的有力工具<sup>[102]</sup>. 许多实验已经利用 QD 将 siRNA 和药物递送至癌细胞<sup>[103]</sup>. 结果显示 QD 介导的纳米载



体具有更高的转染效率(约 98%), 易于制备、成本较低、安全性高、能够有效靶向以及表现出卓越的治疗效果, 因此成为有效的基因传递方法. CNT 作为 siRNA 传递载体, 具有出色的物理化学、物理、机械、电学、热学和光学特性, 最近已成为癌症治疗的替代选择<sup>[104]</sup>. 具有纳米针结构的 CNT 已经能够独立地将 siRNA 传递到细胞质中而不引发细胞死亡<sup>[105]</sup>. 已进行了许多实验利用 CNT 将小分子药物和核酸递送至癌细胞<sup>[106]</sup>. 直径为 10~20 nm 的 Au NPs 由于其出色的生物相容性、易于合成、高表面积体积比和易于表面功能化而成为潜在的 siRNA 递送载体<sup>[107]</sup>. 带有正电荷的季铵、功能化的支链 PEI, 或者涂有阳离子脂质双层的金纳米颗粒以及寡核苷酸与金纳米颗粒表面连接的方法已被报道用于核酸递送<sup>[108]</sup>. 已进行了许多实验利用 Au NPs 将 siRNA 和药物递送至癌细胞<sup>[109]</sup>. Ding 等<sup>[110]</sup>已对用于核酸递送的金纳米颗粒进行了相关综述, 在此不再详细描述.

实现 siRNA 在体内的有效递送是一项富有挑战性的任务, 特别是要实现其针对特定细胞的靶向递送更加具有挑战性. siRNA 的有效递送一直是 RNA 干扰治疗领域长期面临的难题. 然而, 随着 siRNA 递送技术的迅速发展, 我们对于克服这些障碍取得了巨大的进展, 并且在临床应用中展现了更加广阔的前景.

## 5 siRNA 递送系统的优缺点

### 5.1 基于脂质的 siRNA 递送系统

基于脂质的递送系统的合成过程相对较简单, 并能够有效保护 siRNA 免受酶降解, 从而增强其稳定性. 这种递送系统适用于多种细胞类型, 可用于体外和体内应用. 相比于某些其他递送系统, 基于脂质的递送系统通常具有较低的免疫原性, 因此降低了免疫反应的可能性. 这对于基因治疗和递送系统的应用是一个重要的优势.

然而, 基于脂质的递送系统也存在一些限制. 其中一个主要问题是其相对较低的递送效率. 在递送过程中, 一部分 siRNA 可能会丢失或降解, 从而影响治疗效果. 为了提高递送效率, 研究人员需要不断优化脂质体的设计和制备方法, 以确保 siRNA 在适当的时机和位置释放, 并能够达到最佳的治疗效果. 另一个挑战是基于脂质的递送系统通常难以实现组织特异性递送, 即只在特定组织或细胞类型中实现高效递送. 这一问题涉及到脂质体的特异性靶向, 需要更加精确的设计和策略, 以确保 siRNA 仅在目标组织或细胞中被释放和吸收, 从而减少对其他组织的影响.

### 5.2 聚合物介导的 siRNA 递送系统

聚合物介导的 siRNA 递送系统在将 siRNA 有效运输进入细胞内, 并实现对靶标基因的高效抑制方面表现出重要优势. 聚合物具有特异性靶向性, 能够识别和结

合特定的细胞表面受体或标志物, 从而增强针对特定细胞类型的递送效率. 这种特异性靶向性使得聚合物介导的 siRNA 递送系统能够减少对非目标细胞的影响, 提高治疗的特异性, 这在基因治疗领域是一个重要的优点. 此外, 聚合物可以通过调节 siRNA 的释放速率和降解性能, 实现持续且可控的药物释放, 进一步提高治疗效果. 因此, 聚合物介导的 siRNA 递送系统具有巨大的潜力, 为基因治疗提供了新的机会和前景.

聚合物介导的 siRNA 递送系统也面临一些挑战和缺点. 其中, 复杂的设计和制备过程可能会增加制备成本和技术难度, 特别是在大规模生产和临床应用方面可能面临一定的问题. 因此, 需要不断优化制备过程, 以提高生产效率和降低成本. 另一个挑战是一些聚合物在生物环境中可能会发生降解, 导致 siRNA 的释放不稳定, 从而影响治疗效果. 因此, 确保聚合物材料的稳定性和递送效率对于该系统的应用和优化至关重要. 研究人员需要设计具有良好稳定性和控制释放性质的聚合物, 以确保 siRNA 在适当的时机和位置释放, 并能够达到最佳的治疗效果.

### 5.3 siRNA 的偶联和靶向递送系统

siRNA 的偶联和靶向递送系统通过与特定配体结合, 确保 siRNA 只能被靶向的细胞或组织所识别和摄取, 从而减少对其他非目标细胞的影响, 提高治疗的特异性<sup>[111]</sup>. 这种靶向递送系统依赖于特定配体与靶细胞表面的相互作用, 帮助 siRNA 更有效地进入目标细胞内, 提高递送效率, 减少剂量带来的潜在毒性和副作用.

然而, 靶向递送系统也存在一些挑战. 首先, 不同细胞类型可能具有不同的表面标志物, 因此某些细胞类型可能难以特异性地被靶向. 这需要对靶向配体进行精确的设计, 以确保其在目标细胞上具有高亲和性和特异性. 其次, 将 siRNA 与特定配体结合需要精密的制备过程, 这可能增加制备成本和技术难度. 因此, 在开发靶向递送系统时, 需要克服这些挑战, 并进行充分的前期研究和优化, 以确保其特异性和有效性.

### 5.4 无机纳米粒子 siRNA 递送系统

无机纳米粒子 siRNA 递送系统将 siRNA 包裹在无机纳米粒子中, 有效保护 siRNA 免受酶降解, 从而增加其在体内的半衰期, 提高递送系统的稳定性和持久性. 同时, 无机纳米粒子还具有其他的优势, 如多功能性和可调控性. 它们可以与各种功能性分子结合, 如靶向配体、荧光标记物和药物, 使递送系统能够同时实现诊断和治疗的功能. 此外, 无机纳米粒子的大小、形状和表面性质可以进行调控, 以满足不同的 siRNA 递送需求.

然而, 在使用无机纳米粒子 siRNA 递送系统时, 我们需要注意一些潜在问题. 首先, 一些无机材料可能具有潜在的毒性和生物相容性问题. 在开发和应用这些递送系统时, 需要对所使用的无机材料进行严格的生物安

全性评估,以确保其在体内的安全性和可控性。另外,制备高质量的无机纳米粒子需要严格的条件和技术,这可能增加制备成本和技术难度。同时,某些无机纳米粒子可能会引发免疫反应,限制其在临床应用中的使用,因此需要谨慎考虑免疫相关的问题,并进行充分的免疫学研究和评估。

## 6 国内外已经批准上市或临床的 siRNA 药物

### 6.1 已经批准上市或临床的 siRNA 药物采用的化学修饰

近年来, siRNA 药物的治疗领域逐渐由罕见病拓展到常见疾病。目前全球已上市 5 款 siRNA 药物,分别为 Onpatro™ (Patisiran), GIVLAARI™ (Givosiran), Oxlu-mo™ (Lumasiran), Leqvio™ (Inclisiran) 和 AMVUTTRA™ (Vutrisiran)。这些 siRNA 药物中的大多数都采用了 PS 修饰。PS 修饰通常在 siRNA 的正义链的 5'端的前两个核苷酸处,以及反义链的 5'端和 3'端的前两个核苷酸处引入修饰。这种修饰可以增强 siRNA 对核酸酶的抗性,并使 siRNA 分子更容易与血浆蛋白结合,从而延长它们在体内的循环时间<sup>[112]</sup>。这使得 siRNA 能够更长时间地保持稳定,增强其在体内的疗效。

Patisiran 是第一个商业化的 siRNA 治疗药物,于 2018 年 10 月 30 日获得 FDA 批准,用于治疗遗传性淀粉样多发性神经病变(hATTR)<sup>[113]</sup>。Patisiran 是一种化学修饰的 siRNA,其中有 11 个 2'-OMe 修饰(其中 9 个在正义链,2 个在反义链),并靶向甲状腺素转运蛋白(TTR) mRNA<sup>[114]</sup>。2'-OMe 修饰广泛用于保护 siRNA 免受核酸酶的降解。这种修饰取代了 RNA 分子中的 2'-OH 基团,从而增强了其稳定性和对核酸酶的抗性。在 Patisiran 中,2'-OMe 修饰不仅有助于增加 siRNA 的稳定性,还可能提高其与 TTR mRNA 的结合亲和力,从而增强药物的疗效。此外,2'-OMe 修饰还可能降低 Patisiran 在体内的免疫原性,减少免疫反应的风险<sup>[45]</sup>。

Givosiran 是第二个获得市场批准的 siRNA 药物,于 2019 年获得 FDA 批准,用于治疗由肝氨基乙酮丙酸合酶 I (ALAS1)引起的急性肝卟啉病(AHP)。Givosiran 通过靶向 ALAS1 mRNA 来发挥作用,采用了增强化学(ESC)策略进行全修饰。它在两条链的 5'端和反义链的 3'端使用 PS 连接,并保留了 2'-O-Me 修饰,同时引入了少量的 2'-F 修饰。这种选择可能是因为大量使用 2'-F 修饰可能会增加毒性<sup>[115]</sup>。这些修饰的变化增强了 Givosiran 的效力和持续时间,使得以较低的剂量实现所需的药效,并降低给药频率<sup>[34]</sup>。

类似于 Givosiran,目前处于 3 期临床试验的 Fitusiran 也采用了 ESC 设计。它对 21 碱基链和 23 碱基链进行了全修饰,其中包括 21 个 2'-F 修饰和 23 个 2'-OMe 修饰,并在链的末端连接了 6 个 PS<sup>[116]</sup>。

Lumasiran 是第三个获批上市的 siRNA 药物,用于

治疗原发性高草酸尿症 I 型(PH1),于 2020 年 11 月获得 FDA 批准。Lumasiran 采用了 Alnylam 公司最新开发的增强稳定化学 ESC-GalNAc 共轭技术,该技术可使皮下给药具有更强的效力和持久性,并具有广泛的治疗指数。Lumasiran 具有 6 个 PS 修饰、34 个 2'-O-Me 修饰和 10 个 2'-F 修饰。这些修饰在提高 Lumasiran 的疗效和稳定性方面起着关键作用。磷酸骨架上的 PS 修饰增加了 Lumasiran 与 RISC 之间的结合亲和力,从而增强了 siRNA 的成熟和效力<sup>[114]</sup>。这种修饰可以提高 siRNA 的稳定性和抗酶降解性,并有助于确保 siRNA 能够正确加载到 RISC 中,实现对目标 mRNA 的选择性降解。核糖上的 2'-O-Me 修饰增加了 Lumasiran 的稳定性和半衰期,2'-F 修饰使 Lumasiran 更容易采用 C3'-endo 构象,并增强其与靶标 mRNA 的结合亲和力<sup>[114]</sup>。

与 Lumasiran 类似,处于 3 期临床试验的 Nedosiran 也用于治疗原发性高草酸尿症。不同之处在于,Lumasiran 通过 siRNA 介导的羟基酸氧化酶 1 (HAO1) mRNA 的降解来减少草酸盐的产生,而 Nedosiran 通过阻断草酸盐代谢的最终途径来减少草酸盐的积累<sup>[97]</sup>,从而具有治疗所有三种 PH 类型的潜力。Nedosiran 的靶标是肝乳酸脱氢酶(LDH),它控制乙醛酸代谢的最后一步。相比之下,LDH 可能是一个比 HAO1 更有效的靶标<sup>[117]</sup>,因此,人们对 Nedosiran 3 期临床试验的结果更加期待。在化学修饰方面,Nedosiran 与 Lumasiran 类似,正义链的 5'端和反义链的 5'和 3'端都有 PS 修饰,并且正义链与 GalNAc 偶联。Nedosiran 由 22 个碱基的反义链和 36 个碱基的正义链组成。在这些碱基中,19 个采用 2'-F 修饰,35 个采用 2'-OMe 修饰<sup>[118]</sup>。这些化学修饰的引入使得 Nedosiran 具有更高的效力和稳定性,从而增强了其在治疗原发性高草酸尿症方面的潜力。随着 Nedosiran 的临床试验结果的揭晓,我们将进一步了解其疗效和安全性。

Inclisiran 是第四个获得批准上市的 siRNA 药物,用于治疗高胆固醇及混合血脂异常,于 2020 年 12 月获得 FDA 批准。Inclisiran 针对前蛋白转化酶枯草溶菌素/Kexin9 型(PCSK9) mRNA 进行靶向,通过与 GalNAc 偶联递送至肝细胞。相较于其他 siRNA 疗法,Inclisiran 治疗高胆固醇及混合血脂异常这一普遍疾病的影响可能更为广泛<sup>[114]</sup>。Inclisiran 具有 6 个 PS 修饰、32 个 2'-O-Me 修饰、11 个 2'-F 修饰和 1 个 2'-O-MOE 修饰<sup>[97]</sup>。2'-O-Me 修饰、2'-F 修饰和 2'-O-MOE 修饰的组合有助于降低免疫原性和脱靶效应<sup>[119]</sup>。

国内的 RBD7022 和 JS401 也是用于治疗高脂血症的 siRNA 药物,分别靶向 PCSK9 mRNA 和血管生成素样蛋白 3 (ANGPTL3) mRNA,它们分别于 2022 年 9 月 19 日和 2023 年 4 月 13 日获得国内临床批准。这些国内 siRNA 药物的批准标志着中国在 siRNA 药物研发领域的重要进展。对于高脂血症患者来说,这些 siRNA 药物的批准为其提供了一种新的治疗选择,为患者的健康带



来了希望。

Vutrisiran 是第五个获批上市的 siRNA 药物, 用于治疗 ATTR, 包括 hATTR 和野生型 ATTR 淀粉样变性 (wtATTR)<sup>[120]</sup>, 于 2022 年 8 月获 FDA 批准上市。Vutrisiran 由一条 21 碱基链和一条 23 碱基链组成, 其中包含 6 个 PS 修饰分布在链末端。通过 ESC 设计, Vutrisiran 的 44 个核苷酸中, 有 35 个核苷酸含有 2'-O-Me 修饰, 9 个核苷酸含有 2'-F 修饰。PS、2'-O-Me 和 2'-F 修饰的组合提高了 Vutrisiran 的稳定性, 并最大限度地减少了其代谢不稳定性<sup>[121]</sup>。

与前面进行全修饰或很多修饰的 siRNA 药物不同, Teprasiran 是一种经过最低限度修饰的 siRNA 药物, 由两条 19 碱基链和 19 个 2'-OMe 修饰碱基组成, 磷酸盐骨架没有修饰。Teprasiran 靶向 p53 蛋白 mRNA, 用于治疗急性肾损伤(AKI)<sup>[122]</sup>。与 Teprasiran 类似, Cosdosiran 也是由两个 19 碱基链组成的双链 siRNA 药物, 其中正义链中有 9 个 2'-OMe 修饰的碱基, 从而提高特异性并减少不必要的脱靶效应<sup>[123]</sup>。Cosdosiran 靶向半胱天冬酶 2 (caspase 2) mRNA, 用于治疗非动脉炎性前部缺血性视神经病变(NAION)以及其他导致视网膜神经节细胞死亡的视神经病变, 如青光眼。目前, 这两种药物都处于 3 期临床试验阶段。此外, 国内针对 NAION 的 RBD1007 也靶向 caspase 2 mRNA, 正在进行 3 期临床试验。

Tivanisiran 是一种处于 3 期临床试验阶段的 siRNA 药物, 用于治疗眼痛和干眼病(DED)。它靶向香草酸受体(TRPV1) mRNA。与之前介绍的 siRNA 药物不同, Tivanisiran 是一种完全未修饰的裸 siRNA 分子。它由两条 19 碱基链组成, 既没有碱基替代, 也没有磷酸骨架修饰。这可能与特殊的给药器官有关。Tivanisiran 的特殊之处在于其给药途径和特殊的给药器官。研究表明, 尽管缺乏化学修饰, Tivanisiran 仍能迅速吸收到眼睛中<sup>[124]</sup>。这可能与眼睛作为给药器官的特性有关, 使得裸 siRNA 能够绕过全身药代动力学屏障并被有效吸收。作为一种未修饰的 siRNA 药物, Tivanisiran 的研发代表了对 siRNA 治疗潜力的探索和创新。尽管缺乏化学修饰, Tivanisiran 可能具有一些独特的优势, 如简化的制备工艺和较低的制备成本。然而, 对于裸 siRNA 药物的开发还需要更多的研究和临床实验验证其安全性、稳定性和疗效。

## 6.2 已经批准上市或临床的 siRNA 药物采用的递送系统

Patisiran 通过 LNP 递送系统将 siRNA 递送到肝脏<sup>[125]</sup>, LNP 的脂质成分包括 Dlin-MC3-DMA、DSPC、胆固醇和 PEG-DMG。Dlin-MC3-DMA 有助于 LNP 的形成、摄取和释放, 胆固醇和 DSPC 增加了药物的稳定性, PEG-DMG 则有助于药物的稳定性和循环时间<sup>[126]</sup>。尽管 LNP 已被证明在临床上具有实用性, 但仍存在一些

缺点。其中一个主要问题是潜在的毒性, 并且由于其较大的尺寸(相对于 siRNA 而言), 可能会引起扩散系数和药代动力学的不良问题<sup>[30]</sup>。

除了 Onpattro™, 其他四种已经获得批准上市的 siRNA 药物都采用了 GalNAc-siRNA 偶联体系。这种体系能够克服其他传递系统引起的药物安全性、有效性和特异性等问题。例如, Inclisiran 与 GalNAc 偶联, 使得药物能够被肝细胞精确、靶向地摄取<sup>[127]</sup>。通过 GalNAc-siRNA 偶联体系的设计, Vutrisiran 能够有效地与 ASGPR 结合, 使得每三个月只需进行一次皮下注射, 具有更好的代谢稳定性和更高的效力<sup>[128]</sup>。Fitusiran 靶向抗凝血酶(AT)的 mRNA, Fitusiran 与 GalNAc 的偶联使得 siRNA 复合物能够被递送到抗凝血酶在肝脏中的产生部位, 从而导致凝血酶水平升高, 促进止血。

在临床实验中, 除了利用 LNP 和 GalNAc 偶联递送外, 也有裸 siRNA 直接给药的。例如 Teprasiran (QPI-1002), Cosdorian (QPI-1007) 和 Tivanisiran。相比使用递送系统, 裸 siRNA 直接给药可以简化治疗过程, 并且在某些特定情况下可能具有优势。这些药物的研究和临床试验旨在评估裸 siRNA 的安全性和有效性, 以及确定其在特定疾病治疗中的潜力。

Teprasiran 以裸 siRNA 分子的形式进行给药, 这是因为全身给药的裸 siRNA 通常会被肾脏内化和清除。而对于治疗 AKI 的 Teprasiran 来说, 这种优先的肾脏定位是非常有利的。研究表明, 静脉注射的裸 Teprasiran 会迅速被肾脏排出, 然后被近端肾小管细胞(PTC)重吸收<sup>[129]</sup>。尽管 Teprasiran 缺乏修饰和靶向配体, 但由于 PTC 具有特殊的结构, 它仍然能够显著地被细胞内化<sup>[130]</sup>。

而对于 Cosdosiran 和 Tivanisiran 来说, 它们同样不需要使用递送系统, 与 Teprasiran 裸 siRNA 给药的原理有所不同。Cosdosiran 和 Tivanisiran 是通过直接注射到眼内视网膜区域进行给药。视网膜神经节细胞能够轻松吸收这种 siRNA 分子, 而且不会引起免疫反应<sup>[131]</sup>。眼部具有免疫特权, 这使得 Cosdosiran 和 Tivanisiran 能够避开与全身给药相关的许多药代动力学障碍<sup>[127]</sup>。

综上所述, 我们对已经上市和部分临床阶段的 siRNA 药物所采用的化学修饰和递送体系进行统计和总结(如表 1 所示)。总之, siRNA 药物的成功上市和临床应用为基因治疗领域带来了重要的突破。化学修饰方法的应用以及递送系统的开发为 siRNA 药物的稳定性和疗效提供了关键的支持。随着技术的不断发展和进步, 我们有望看到更多创新的 siRNA 药物问世, 为疾病治疗提供更多的选择和希望。

## 7 未来和展望

RNA 干扰技术作为一种有效的基因沉默策略, 自 1998 年被发现以来取得了巨大的进展。从研究发



表 1 已经上市和部分临床阶段的 siRNA 药物

Table 1 The FDA has approved siRNA drugs and some in the clinical stage

| 药物名称                      | 阶段              | 化学修饰                                      | 靶点                           | 靶向递送系统(器官)        | 治愈疾病                                  |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Onpatro™<br>(patisiran)   | 2018 年 10 月获批上市 | 2'-O-Me                                   | 甲状腺素转运蛋白 (TTR)               | LNP(肝脏)           | 遗传性淀粉样多发性神经病变(hATTR)                  |
| GIVLAARI™<br>(givosiran)  | 2019 年获批上市      | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F<br>ESC 设计           | 氨基乙酰丙酸合酶 I (ALAS1)           | GalNAc-siRNA(肝脏)  | 急性肝卟啉症(AHP)                           |
| Fitusiran                 | 3 期临床           | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F<br>ESC 设计           | 抗凝血酶(AT)                     | GalNAc-siRNA(肝脏)  | 血友病 A 和 B                             |
| Oxlumo™<br>(lumasiran)    | 2020 年 11 月获批上市 | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F<br>ESC 设计           | 羧基氧化酶 I (HAOI)或称乙醇酸氧化酶(GO)   | GalNAc-siRNA (肝脏) | 原发性高草酸尿症 I 型 (PH1)                    |
| Nedosiran                 | 3 期临床           | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F                     | 乳酸脱氢酶(LDH)                   | GalNAc-siRNA(肝脏)  | 原发性高草酸尿症(PH)                          |
| Leqvio™<br>(inclisiran)   | 2020 年 12 月获批上市 | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F<br>2'-MOE<br>ESC 设计 | 前蛋白转化酶枯草溶菌素/Kexin9 型 (PCSK9) | GalNAc-siRNA(肝脏)  | 高胆固醇及混合血脂异常                           |
| Amvuttra™<br>(vutrisiran) | 2022 年 8 月获批上市  | PS<br>2'-O-Me<br>2'-F<br>ESC 设计           | 甲状腺素转运蛋白 (TTR)               | GalNAc-siRNA(肝脏)  | 淀粉样蛋白甲状腺素介导 (ATTR)的淀粉样变性              |
| Teprasiran                | 3 期临床           | 2'-OMe                                    | P53 蛋白                       | 无(肾脏)             | 急性肾损伤(AKI)                            |
| Cosdosiran                | 3 期临床           | 2'-OMe<br>L-DNA 胞嘧啶<br>倒置脱氧碱基             | 半胱天冬酶-2 (caspase 2)          | 无(眼睛)             | 非动脉炎性前部缺血性视神经病变(NAION)和原发性角型青光眼(POAG) |
| Tivanisiran               | 3 期临床           | 无                                         | 香草酸受体(TRPV1)                 | 无(眼睛)             | 眼痛和干眼病(DED)                           |

临床试验, 这项技术已经迅速发展. 自 2006 年 RNA 干扰的研究获得诺贝尔奖以来, 大型制药公司已经投入数十亿美元用于人类基因沉默治疗的开发. siRNA 作为药物的发现被认为是药物开发中最重要的治疗进展之一, 其中一个原因是该分子可用于靶向几乎所有与疾病相关的基因. 多年来, 研究人员一直在努力克服 siRNA 作为治疗方式所面临的各种障碍, 并取得了重要进展. 许多有效的 siRNA 递送策略已经被报道, 包括 siRNA 的化学修饰或缀合、基于脂质和聚合物的递送, 以及配体靶向的 siRNA 递送等策略. 这些策略有望改善 siRNA 的生物学特性, 如稳定性、细胞摄取和递送效率. siRNA 疗法具有巨大的治疗潜力. 近年来, 许多基于 siRNA 的药物正在开发, 用于治疗多种疾病, 包括病毒感染、心血管疾病、遗传性疾病和癌症等. 许多公司和实验室都专注于 siRNA 技术的研究和开发. 然而, siRNA 药物的开发过程是具有挑战性的. 这是因为需要克服复杂的生理障碍, 以有效且安全地将 siRNA 递送到目标组织和细胞, 并增强 siRNA 的稳定性和特异性, 同时降低其潜在的脱

靶效应.

克服 siRNA 药物面临的挑战对其临床转化至关重要, 但同时也为我们提供了许多改善疾病治疗效果和安全性的机会. 随着技术的不断进步和对 siRNA 药物的深入理解, 我们有望在未来看到更多创新和突破. 未来的发展方向可能包括: (1)使用新的靶向配体和化学探针进行递送: 通过利用能够特异性结合患病细胞表面标记的靶向配体和化学探针, 可以提高 siRNA 的靶向性, 减少对非目标细胞的影响<sup>[132]</sup>; (2)提高递送效率: 研究人员正在努力了解有多少 siRNA 能够进入细胞质, 并寻找更好的方法促进这一过程<sup>[20,133]</sup>, 通过改进递送系统和优化递送策略, 可以提高 siRNA 的递送效率; (3)扩大治疗窗口: 为了最小化副作用并确保药物的有效性, 可以使用低毒性材料和合理的药物设计. 这有助于扩大治疗窗口, 提高治疗效果; (4)设计具有明确可代谢降解产物的材料: 在基于 siRNA 的药物需要重复给药条件下, 设计具有明确可代谢降解产物的材料非常重要. 这可以帮助减少累积和潜在的毒性; (5)简化配制程序: 简化 siRNA

药物的制备过程可以提高制备的方便性和效率. 这有助于推动 siRNA 药物的临床应用; (6)探索其他器官的递送: 除了肝脏, 探索将 siRNA 递送至其他器官, 如肺部、肾脏和中枢神经系统等, 将扩大 siRNA 药物的应用范围. 此外, 结合计算机技术, 如人工智能和机器学习, 以及大数据分析进行药物设计是一个新的研发趋势<sup>[134]</sup>. 通过智能设计和精准调控, 可以开发出具有靶向性、示踪性和与其他药物共递送性的多功能 siRNA 纳米药物, 以实现协同增效. 这也是未来 siRNA 药物发展的重要方向之一<sup>[132, 134-135]</sup>. 通过持续的研究和创新, 我们可以期待看到更多智能设计的 siRNA 纳米药物的问世, 为疾病治疗带来新的突破. 这些发展方向将进一步推动 siRNA 药物的临床转化, 并为患者提供更有效和个体化的治疗选择.

## 作者简介



李琛, 南京大学化学化工学院 2021 级化学生物学博士研究生. 2021 年进入南京大学化学化工学院张艳教授课题组进行博士研究生阶段学习. 目前主要从事用于核酸药物的小干扰 RNA 递送与疾病治疗的研究.



司笑, 南京大学化学化工学院 2021 级硕士研究生. 2021 年进入南京大学化学化工学院张艳教授课题组进行硕士研究生阶段学习. 目前主要研究脂质纳米颗粒递送 mRNA 的横向课题.



李金波, 副教授, 博士生导师. 2017 年起受聘南京大学化学化工学院副教授, 主要研究方向为核酸化学生物学. 现已在 *J. Am. Chem. Soc.*、*Angew. Chem. Int. Ed.*、*ACS Nano*、*Chem. Sci.*、*Chem. Soc. Rev.* 等期刊发表论文 30 余篇, 申请发明专利 5 项, 获得授权 4 项. 主持或参与国家及省部级课题多项.



张艳, 教授, 博士生导师, 南京大学化学化工学院副院长. 2006 年 9 月加入南京大学任南京大学化学化工学院教授, 2016 年起任南京大学化学化工学院副院长. 入选南京大学首批登峰 B 人才支持计划, 获首批江苏省杰出青年基金, 入选中组部第二批青年拔尖人才支持计划. 主要研究领域为光化学生物学, 以通讯作者在 *J. Am. Chem. Soc.*、*Angew. Chem. Int. Ed.* 等期刊发表 SCI 论文多篇. 任江苏省化学化工学会理事会化学生物学专业委员会主任委员、中国感光学会光化学及光生物专业委员会副主任、中国化学会青委会委员等. 目前主持国家自然科学基金重点项目、面上项目等.

## References

- [1] Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806.
- [2] Dana, H.; Chalbatani, G. M.; Mahmoodzadeh, H.; Karimloo, R.; Rezaiean, O.; Moradzadeh, A.; Mehmandoust, N.; Moazzen, F.; Mazraeh, A.; Marmari, V.; Ebrahimi, M.; Rashno, M. M.; Abadi, S. J.; Gharagouzlo, E. *Int. J. Biomed. Sci.* **2017**, *13*, 48.
- [3] Tomari, Y.; Zamore, P. D. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 517.
- [4] Yamankurt, G.; Stawicki, R. J.; Posadas, D. M.; Nguyen, J. Q.; Carthew, R. W.; Mirkin, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 1312.
- [5] Feng, J.; Yu, W.; Xu, Z.; Hu, J.; Liu, J.; Wang, F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 22613.
- [6] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* **2001**, *411*, 494.
- [7] Tolentino, M. J.; Brucker, A. J.; Fosnot, J.; Ying, G. S.; Wu, I. H.; Malik, G.; Wan, S.; Reich, S. J. *Retina* **2004**, *24*, 132.
- [8] Davis, M. E.; Zuckerman, J. E.; Choi, C. H.; Seligson, D.; Tolcher, A.; Alabi, C. A.; Yen, Y.; Heidel, J. D.; Ribas, A. *Nature* **2010**, *464*, 1067.
- [9] Ranasinghe, P.; Addison, M. L.; Dear, J. W.; Webb, D. J. *Br. J. Pharmacol.* **2022**, *179*, 1.
- [10] Zamore, P. D.; Tuschl, T.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P. *Cell* **2000**, *101*, 25.
- [11] Iwakawa, H. O.; Tomari, Y. *Mol. Cell* **2022**, *82*, 30.
- [12] Svoboda, P. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1237.
- [13] Rivas, F. V.; Tolia, N. H.; Song, J. J.; Aragon, J. P.; Liu, J.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 340.
- [14] Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188.
- [15] Hutvagner, G.; Zamore, P. D. *Science* **2002**, *297*, 2056.
- [16] Wittup, A.; Ai, A.; Liu, X.; Hamar, P.; Trifonova, R.; Charisse, K.; Manoharan, M.; Kirchhausen, T.; Lieberman, J. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 870.
- [17] Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 421.
- [18] Dixon, S. J.; Stockwell, B. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 549.
- [19] Finan, C.; Gaulton, A.; Kruger, F. A.; Lumbers, R. T.; Shah, T.; Engmann, J.; Galver, L.; Kelley, R.; Karlsson, A.; Santos, R.; Overington, J. P.; Hingorani, A. D.; Casas, J. P. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, 1166.
- [20] Gilleron, J.; Querbes, W.; Zeigerer, A.; Borodovsky, A.; Marsico, G.; Schubert, U.; Manygoats, K.; Seifert, S.; Andree, C.; Stoter, M.; Epstein-Barash, H.; Zhang, L.; Kotliansky, V.; Fitzgerald, K.; Fava, E.; Bickle, M.; Kalaidzidis, Y.; Akinc, A.; Maier, M.; Zerial, M. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638.
- [21] Fitzgerald, K.; White, S.; Borodovsky, A.; Bettencourt, B. R.; Strahs, A.; Clausen, V.; Wijngaard, P.; Horton, J. D.; Taubel, J.; Brooks, A.; Fernando, C.; Kauffman, R. S.; Kallend, D.; Vaishnav, A.; Simon, A. N. *Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 41.
- [22] Sheridan, C. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 1385.

- [23] Resnier, P.; Montier, T.; Mathieu, V.; Benoit, J. P.; Passirani, C. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6429.
- [24] Nóbrega, C.; Mendonça, L.; Matos, C. A.; SpringerLink. *A Handbook of Gene and Cell Therapy*, 1st ed., Springer, Berlin/Heidelberg Germany, **2020**.
- [25] Watts, J. K.; Corey, D. R. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 365.
- [26] Liang, X. H.; Nichols, J. G.; De Hoyos, C. L.; Croke, S. T. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 9840.
- [27] (a) Mendonça, M. C. P.; Kont, A.; Kowalski, P. S.; O'Driscoll, C. M. *Drug Discov. Today* **2023**, *28*, 103505. (b) Khan, S. H. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *16*, 326.
- [28] Antimisariis, S. G.; Marazioti, A.; Kannavou, M.; Natsaridis, E.; Gkartziou, F.; Kogkos, G.; Mourtas, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *174*, 53.
- [29] (a) Guo, J.; Cahill, M. R.; McKenna, S. L.; O'Driscoll, C. M. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1396. (b) Guo, J.; Russell, E. G.; Darcy, R.; Cotter, T. G.; McKenna, S. L.; Cahill, M. R.; O'Driscoll, C. M. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 940.
- [30] Dowdy, S. F. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 222.
- [31] Behlke, M. A. *Oligonucleotides* **2008**, *18*, 305.
- [32] Selvam, C.; Mutisya, D.; Prakash, S.; Ranganna, K.; Thilagavathi, R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 665.
- [33] (a) Eckstein, F. *Nucleic Acid. Ther.* **2014**, *24*, 374. (b) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Rohl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliarsky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H. P. *Nature* **2004**, *432*, 173.
- [34] Foster, D. J.; Brown, C. R.; Shaikh, S.; Trapp, C.; Schlegel, M. K.; Qian, K.; Sehgal, A.; Rajeev, K. G.; Jadhav, V.; Manoharan, M.; Kuchimanchi, S.; Maier, M. A.; Milstein, S. *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 708.
- [35] Deleavey, G. F.; Damha, M. J. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937.
- [36] (a) Braasch, D. A.; Jensen, S.; Liu, Y.; Kaur, K.; Arar, K.; White, M. A.; Corey, D. R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967. (b) Amarzguoui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H. *Nucleic Acids. Res.* **2003**, *31*, 589.
- [37] Harborth, J.; Elbashir, S. M.; Vandeburgh, K.; Manning, H.; Scaringe, S. A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2003**, *13*, 83.
- [38] Hall, A. H.; Wan, J.; Shaughnessy, E. E.; Ramsay Shaw, B.; Alexander, K. A. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5991.
- [39] (a) Selvam, C.; Thomas, S.; Abbott, J.; Kennedy, S. D.; Rozners, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2068. (b) Iwase, R.; Toyama, T.; Nishimori, K. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1451.
- [40] Mutisya, D.; Hardcastle, T.; Cheruiyot, S. K.; Pallan, P. S.; Kennedy, S. D.; Egli, M.; Kelley, M. L.; Smith, A. V. B.; Rozners, E. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8142.
- [41] (a) Yang, X.; Sierant, M.; Janicka, M.; Peczek, L.; Martinez, C.; Hassell, T.; Li, N.; Li, X.; Wang, T.; Nawrot, B. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1214. (b) Wu, S. Y.; Yang, X.; Gharpure, K. M.; Hatakeyama, H.; Egli, M.; McGuire, M. H.; Nagaraja, A. S.; Miyake, T. M.; Rupaimoole, R.; Pecot, C. V.; Taylor, M.; Pradeep, S.; Sierant, M.; Rodriguez-Aguayo, C.; Choi, H. J.; Previs, R. A.; Armaiz-Pena, G. N.; Huang, L.; Martinez, C.; Hassell, T.; Ivan, C.; Sehgal, B.; Singhania, R.; Han, H. D.; Su, C.; Kim, J. H.; Dalton, H. J.; Kovvali, C.; Keyomarsi, K.; McMillan, N. A.; Overwijk, W. W.; Liu, J.; Lee, J. S.; Baggerly, K. A.; Lopez-Berestein, G.; Ram, P. T.; Nawrot, B.; Sood, A. K. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3459.
- [42] Threlfall, R. N.; Torres, A. G.; Krivenko, A.; Gait, M. J.; Caruthers, M. H. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 746.
- [43] (a) Hu, B.; Zhong, L.; Weng, Y.; Peng, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; Liang, X. J. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 101. (b) Findlay, D.; Herries, D. G.; Mathias, A. P.; Rabin, B. R.; Ross, C. A. *Biochem. J.* **1962**, *85*, 152.
- [44] Shen, X.; Corey, D. R. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1584.
- [45] Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131.
- [46] Ray, K. K.; Landmesser, U.; Leiter, L. A.; Kallend, D.; Dufour, R.; Karakas, M.; Hall, T.; Troquay, R. P.; Turner, T.; Visseren, F. L.; Wijngaard, P.; Wright, R. S.; Kastelein, J. J. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1430.
- [47] (a) Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarrés, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B. J. *Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247. (b) Zanardi, T. A.; Kim, T. W.; Shen, L.; Serota, D.; Papagiannis, C.; Park, S. Y.; Kim, Y.; Henry, S. P. *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 233.
- [48] Kenski, D. M.; Butora, G.; Willingham, A. T.; Cooper, A. J.; Fu, W.; Qi, N.; Soriano, F.; Davies, I. W.; Flanagan, W. M. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e5.
- [49] Manoharan, M.; Akinc, A.; Pandey, R. K.; Qin, J.; Hadwiger, P.; John, M.; Mills, K.; Charisse, K.; Maier, M. A.; Nechev, L.; Greene, E. M.; Pallan, P. S.; Rozners, E.; Rajeev, K. G.; Egli, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2284.
- [50] Deleavey, G. F.; Watts, J. K.; Alain, T.; Robert, F.; Kalota, A.; Aishwaryya, V.; Pelletier, J.; Gewirtz, A. M.; Sonenberg, N.; Damha, M. J. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 4547.
- [51] Fucini, R. V.; Haringsma, H. J.; Deng, P.; Flanagan, W. M.; Willingham, A. T. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 205.
- [52] Khvorova, A.; Watts, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238.
- [53] (a) Chiu, Y. L.; Rana, T. M. *RNA* **2003**, *9*, 1034. (b) Sipa, K.; Sochacka, E.; Kazmierczak-Baranska, J.; Maszewska, M.; Janicka, M.; Nowak, G.; Nawrot, B. *RNA* **2007**, *13*, 1301.
- [54] Anderson, B. R.; Muramatsu, H.; Nallagatla, S. R.; Bevilacqua, P. C.; Sansing, L. H.; Weissman, D.; Kariko, K. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5884.
- [55] Watts, J. K.; Deleavey, G. F.; Damha, M. J. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 842.
- [56] Brown, C. R.; Gupta, S.; Qin, J.; Racie, T.; He, G.; Lentini, S.; Malone, R.; Yu, M.; Matsuda, S.; Shulga-Morskaya, S.; Nair, A. V.; Theile, C. S.; Schmidt, K.; Shahraz, A.; Goel, V.; Parmar, R. G.; Zlatev, I.; Schlegel, M. K.; Nair, J. K.; Jayaraman, M.; Manoharan, M.; Brown, D.; Maier, M. A.; Jadhav, V. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 11827.
- [57] (a) Kim, W. J.; Kim, S. W. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 657. (b) Wagner, E. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1005. (c) Sun, J.; Wang, J. C.; Yang, Z. *J. Chinese J. Chem.* **2015**, *33*, 79.
- [58] Tatiparti, K.; Sau, S.; Kashaw, S. K.; Iyer, A. K. *Nanomaterials (Basel)* **2017**, *7*, 77.
- [59] Aronson, S. J.; Veron, P.; Collaud, F.; Hubert, A.; Delahais, V.; Honnet, G.; de Knecht, R. J.; Junge, N.; Baumann, U.; Di Giorgio, A.; D'Antiga, L.; Ginocchio, V. M.; Brunetti-Pierri, N.; Labruno, P.; Beuers, U.; Bosma, P. J.; Mingozzi, F. *Hum. Gene Ther.* **2019**, *30*, 1297.
- [60] Bryson, T. E.; Anglin, C. M.; Bridges, P. H.; Cottle, R. N. *Yale J. Biol. Med.* **2017**, *90*, 553.
- [61] Nguyen, G. N.; Everett, J. K.; Kafle, S.; Roche, A. M.; Raymond, H. E.; Leiby, J.; Wood, C.; Assenmacher, C. A.; Merricks, E. P.; Long, C. T.; Kazazian, H. H.; Nichols, T. C.; Bushman, F. D.; Sabatino, D. E. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 47.
- [62] (a) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541. (b) Zu, H.; Gao, D. *AAPS J.* **2021**, *23*, 78. (c) Xie, W.; Chen, B.; Wong, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 735.
- [63] Guo, J.; Fisher, K. A.; Darcy, R.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. *Biosyst.* **2010**, *6*, 1143.
- [64] (a) Singh, R. P.; Hidalgo, T.; Cazade, P. A.; Darcy, R.; Cronin, M. F.; Dorin, I.; O'Driscoll, C. M.; Thompson, D. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 1358. (b) Zhao, W.; Hou, X.; Vick, O. G.; Dong, Y. *Biomaterials* **2019**, *217*, 119291. (c) Zhuang, Y.; Cui, W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *176*, 113885.
- [65] Fenske, D. B.; Cullis, P. R. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 25.
- [66] Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36.
- [67] Oh, Y. K.; Park, T. G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 850.
- [68] Hayes, M. E.; Drummond, D. C.; Hong, K.; Park, J. W.; Marks, J. D.; Kirpotin, D. B. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 429.
- [69] (a) Guven, E. *Int. J. Impot. Res.* **2020**, *32*, 578. (b) Meenakshi Sundaram, D. N.; Phianwong, S.; Kc, R.; Ostergaard, H.; Uludag, H. *Acta. Biomater.* **2022**, *148*, 279.
- [70] Samaridou, E.; Heyes, J.; Lutwyche, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *154-155*, 37.
- [71] Maeki, M.; Uno, S.; Niwa, A.; Okada, Y.; Tokeshi, M. *J. Control. Release* **2022**, *344*, 80.
- [72] (a) Altinoglu, S.; Wang, M.; Xu, Q. *Nanomedicine (Lond)* **2015**, *10*, 643. (b) Zhang, Y.; Sun, C.; Wang, C.; Jankovic, K. E.; Dong, Y. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 12181.
- [73] (a) Dong, Y.; Love, K. T.; Dorkin, J. R.; Sirirungruang, S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Bogorad, R. L.; Yin, H.; Chen, Y.; Vegas, A. J.; Alabi, C. A.; Sahay, G.; Olejnik, K. T.; Wang, W.; Schroeder, A.; Lytton-Jean, A. K.; Siegwart, D. J.; Akinc, A.; Barnes, C.; Barros, S. A.; Carioto, M.; Fitzgerald, K.; Hettinger, J.; Kumar, V.; Novobrantseva, T. I.; Qin, J.; Querbess, W.; Koteliarsky, V.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 3955. (b) Love, K. T.; Mahon, K. P.; Levins, C. G.; Whitehead, K. A.; Querbess, W.; Dorkin, J. R.; Qin, J.; Cantley, W.; Qin, L. L.; Racie, T.; Frank-Kamenetsky,



- M.; Yip, K. N.; Alvarez, R.; Sah, D. W.; de Fougerolles, A.; Fitzgerald, K.; Kotliansky, V.; Akinc, A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1864.
- [74] Gonzalez-Fernandez, Y.; Imbuluzqueta, E.; Patino-Garcia, A.; Blanco-Prieto, M. J. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 6104.
- [75] Tapeinos, C.; Battaglini, M.; Ciofani, G. *J. Control Release* **2017**, *264*, 306.
- [76] Paunovska, K.; Loughrey, D.; Dahlman, J. E. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 265.
- [77] Kong, W. H.; Park, K.; Lee, M. Y.; Lee, H.; Sung, D. K.; Hahn, S. K. *Biomaterials* **2013**, *34*, 542.
- [78] Yu, Y. H.; Kim, E.; Park, D. E.; Shim, G.; Lee, S.; Kim, Y. B.; Kim, C. W.; Oh, Y. K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 268.
- [79] (a) Yonezawa, S.; Koide, H.; Asai, T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *154-155*, 64. (b) Hu-Lieskovan, S.; Heidel, J. D.; Bartlett, D. W.; Davis, M. E.; Triche, T. J. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8984.
- [80] (a) Lee, S.; Yang, S. C.; Kao, C. Y.; Pierce, R. H.; Murthy, N. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e145. (b) Psimadas, D.; Georgoulas, P.; Valotassiou, V.; Loudos, G. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 2271.
- [81] O'Mary, H. L.; Hanafy, M. S.; Aldayel, A. M.; Valdes, S. A.; Alzhrani, R. F.; Hufnagel, S.; Koleng, J. J.; Cui, Z. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 4496.
- [82] Shen, H.; Sun, T.; Ferrari, M. *Cancer Gene Ther.* **2012**, *19*, 367.
- [83] Ma, Z.; Li, J.; He, F.; Wilson, A.; Pitt, B.; Li, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 755.
- [84] Rai, R.; Alwani, S.; Badea, I. *Polymers (Basel)* **2019**, *11*, 745.
- [85] Gary, D. J.; Puri, N.; Won, Y. Y. *J. Control Release* **2007**, *121*, 64.
- [86] Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 12.
- [87] Pille, J. Y.; Li, H.; Blot, E.; Bertrand, J. R.; Pritchard, L. L.; Opolon, P.; Maksimenko, A.; Lu, H.; Vannier, J. P.; Soria, J.; Malvy, C.; Soria, C. *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 1019.
- [88] Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023.
- [89] Zhang, S.; Zhao, B.; Jiang, H.; Wang, B.; Ma, B. *J. Control Release* **2007**, *123*, 1.
- [90] Urban-Klein, B.; Werth, S.; Abuharbid, S.; Czubayko, F.; Aigner, A. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 461.
- [91] Alshamsan, A.; Hamdy, S.; Samuel, J.; El-Kadi, A. O.; Lavasanifar, A.; Uludag, H. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1420.
- [92] Kesharwani, P.; Tekade, R. K.; Gajbhiye, V.; Jain, K.; Jain, N. K. *Nanomedicine* **2011**, *7*, 295.
- [93] de Fougerolles, A.; Vornlocher, H. P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 443.
- [94] Jeong, J. H.; Mok, H.; Oh, Y. K.; Park, T. G. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 5.
- [95] Sehgal, A.; Barros, S.; Ivanciu, L.; Cooley, B.; Qin, J.; Racie, T.; Hettlinger, J.; Carioto, M.; Jiang, Y.; Brodsky, J.; Prabhala, H.; Zhang, X.; Attarwala, H.; Hutabarat, R.; Foster, D.; Milstein, S.; Charisse, K.; Kuchimanchi, S.; Maier, M. A.; Nechev, L.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Nair, J. K.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Meyers, R.; Sorensen, B.; Simon, A. R.; Dargaud, Y.; Negrier, C.; Camire, R. M.; Akinc, A. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 492.
- [96] Nair, J. K.; Willoughby, J. L.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; van der Sluis, R. J.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958.
- [97] Zhang, M. M.; Bahal, R.; Rasmussen, T. P.; Manautou, J. E.; Zhong, X. B. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *189*, 114432.
- [98] Wolfrum, C.; Shi, S.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Wang, G.; Pandey, R. K.; Rajeev, K. G.; Nakayama, T.; Charrise, K.; Ndungo, E. M.; Zimmermann, T.; Kotliansky, V.; Manoharan, M.; Stoffel, M. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149.
- [99] Biscans, A.; Coles, A.; Haraszti, R.; Echeverria, D.; Hassler, M.; Osborn, M.; Khvorova, A. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 1082.
- [100] Chernikov, I. V.; Vlassov, V. V.; Chernolovskaya, E. L. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 444.
- [101] Hori, T.; Taguchi, Y.; Uesugi, S.; Kurihara, Y. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 190.
- [102] Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969.
- [103] (a) Lo, P. Y.; Lee, G. Y.; Zheng, J. H.; Huang, J. H.; Cho, E. C.; Lee, K. C. *ACS Appl. Bio. Mater.* **2020**, *3*, 5948. (b) Zhang, H.; Ba, S.; Yang, Z.; Wang, T.; Lee, J. Y.; Li, T.; Shao, F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 13634. (c) Ahmadi-Kashani, M.; Dehghani, H.; Zarrabi, A. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *114*, 111055.
- [104] Ghosh, S.; Chakrabarti, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120*, 22681.
- [105] (a) Lu, Q.; Moore, J. M.; Huang, G.; Mount, A. S.; Rao, A. M.; Larcom, L. L.; Ke, P. C. *Nano. Letters* **2004**, *4*, 2473. (b) Bhatnagar, I.; Venkatesan, J.; Kiml, S. K. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 120.
- [106] (a) Kirkpatrick, D. L.; Weiss, M.; Naumov, A.; Bartholomeusz, G.; Weisman, R. B.; Gliko, O. *Materials (Basel)* **2012**, *5*, 278. (b) Liu, Z.; Tabakman, S.; Welsher, K.; Dai, H. *Nano. Res.* **2009**, *2*, 85.
- [107] Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1307.
- [108] Song, W. J.; Du, J. Z.; Sun, T. M.; Zhang, P. Z.; Wang, J. *Small* **2010**, *6*, 239.
- [109] Liang, H.; Tian, H. Y.; Deng, M. X.; Chen, X. S. *Chinese J. Chem.* **2015**, *33*, 1001.
- [110] Ding, Y.; Jiang, Z.; Saha, K.; Kim, C. S.; Kim, S. T.; Landis, R. F.; Rotello, V. M. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1075.
- [111] Janas, M. M.; Schlegel, M. K.; Harbison, C. E.; Yilmaz, V. O.; Jiang, Y.; Parmar, R.; Zlatev, I.; Castoreno, A.; Xu, H.; Shulga-Morskaya, S.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Keirstead, N. D.; Maier, M. A.; Jadhav, V. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 723.
- [112] Seth, P. P.; Tanowitz, M.; Bennett, C. F. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 915.
- [113] Hoy, S. M. *Drugs* **2018**, *78*, 1625.
- [114] Friedrich, M.; Aigner, A. *BioDrugs* **2022**, *36*, 549.
- [115] Janas, M. M.; Jiang, Y.; Schlegel, M. K.; Waldron, S.; Kuchimanchi, S.; Barros, S. A. *Nucleic Acid Ther.* **2017**, *27*, 11.
- [116] Berk, C.; Civenni, G.; Wang, Y.; Steuer, C.; Catapano, C. V.; Hall, J. *Nucleic Acid Ther.* **2021**, *31*, 237.
- [117] Lemoine, S.; Courbebaisse, M. *Nephrol. Ther.* **2022**, *18*, 6S1.
- [118] Liu, A.; Zhao, J.; Shah, M.; Migliorati, J. M.; Tawfik, S. M.; Bahal, R.; Rasmussen, T. P.; Manautou, J. E.; Zhong, X. B. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2022**, *5*, 1007.
- [119] Juliano, R. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6518.
- [120] Keam, S. J. *Drugs* **2022**, *82*, 1419.
- [121] Habtemariam, B. A.; Karsten, V.; Attarwala, H.; Goel, V.; Melch, M.; Clausen, V. A.; Garg, P.; Vaishnav, A. K.; Sweetser, M. T.; Robbie, G. J.; Vest, J. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *109*, 372.
- [122] Thielmann, M.; Corteville, D.; Szabo, G.; Swaminathan, M.; Lamy, A.; Lehner, L. J.; Brown, C. D.; Noiseux, N.; Atta, M. G.; Squiers, E. C.; Erlich, S.; Rothenstein, D.; Molitoris, B.; Mazer, C. D. *Circulation* **2021**, *144*, 1133.
- [123] Ahmed, Z.; Kalinski, H.; Berry, M.; Almasieh, M.; Ashush, H.; Alper, N.; Brafman, A.; Spivak, I.; Prasad, N.; Mett, I.; Shalom, E.; Alpert, E.; Di Polo, A.; Feinstein, E.; Logan, A. *Cell Death. Dis.* **2011**, *2*, e173.
- [124] Moreno-Montanes, J.; Bleau, A. M.; Jimenez, A. I. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 421.
- [125] Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 129.
- [126] Zhang, X.; Goel, V.; Robbie, G. J. *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60*, 573.
- [127] Frampton, J. E., *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2023**, *23*, 219.
- [128] Feng, R.; Patil, S.; Zhao, X.; Miao, Z.; Qian, A. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 710738.
- [129] Molitoris, B. A.; Dagher, P. C.; Sandoval, R. M.; Campos, S. B.; Ashush, H.; Fridman, E.; Brafman, A.; Faerman, A.; Atkinson, S. J.; Thompson, J. D.; Kalinski, H.; Skaliter, R.; Erlich, S.; Feinstein, E. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 1754.
- [130] Thompson, J. D.; Kornbrust, D. J.; Foy, J. W.; Solano, E. C.; Schneider, D. J.; Feinstein, E.; Molitoris, B. A.; Erlich, S. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 255.
- [131] Solano, E. C.; Kornbrust, D. J.; Beaudry, A.; Foy, J. W.; Schneider, D. J.; Thompson, J. D. *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 258.
- [132] Nicolescu, C.; Schilb, A.; Kim, J.; Sun, D.; Hall, R.; Gao, S.; Gilmore, H.; Schiemann, W. P.; Lu, Z. *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, <https://doi.org/10.1021/cbmi.3c00011>.
- [133] Sahay, G.; Querbes, W.; Alabi, C.; Eltoukhy, A.; Sarkar, S.; Zurenko, C.; Karagiannis, E.; Love, K.; Chen, D.; Zoncu, R.; Buganim, Y.; Schroeder, A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 653.
- [134] Han, J.; Zhang, T.; Zhou, X. *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, *1*, 140.
- [135] Wei, J.; Ji, C.; Wang, Y.; Tan, J.; Yuan, Q.; Tan, W. *Chem. Biomed. Imaging* **2023**, *1*, 18.

(Cheng, B.)