



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

exNA-modifikaatiot siRNA-tekniologiassa

Nelli Kärkkäinen

Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

11.5.2026

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Nelli Annika Isabell Kärkkäinen

Otsikko: exNA-modifikaatiot siRNA-tekniologiassa

Ohjaaja: Heidi Korhonen

Sivumäärä: 13 sivua + liitteet 2 sivua

Päivämäärä: 11.5.2026

Oligonukleotideilla on tutkittu olevan terapeuttisia ominaisuuksia geneettisten sairauksien hoidossa ja niitä hyödynnetään lääkkeissä jo nykypäivänä. Yksi terapeuttisten oligonukleotidien alaluokka on pienet häiritsevät RNA:t (siRNA), jotka vaikuttavat geneettisten sairauksien geenien ilmentymiseen estämällä proteiinisynteesin. Niiden terapeuttista potentiaalia rajoittaa heikko kestävyys elimistön nukleaaseille, heikko kulkeutuminen kohdekudokseen ja mahdolliset immuunijärjestelmän aktivoinnit. Näiden ongelmien ratkaisemiseksi on kehitetty erilaisia kemiallisia modifikaatioita, kuten pidennetty nukleiinihappo eli exNA-modifikaatio (engl. *extended nucleic acid*).

exNA-modifikaatio lisää yhden hiiliatomin yhtä modifioitua nukleotidiyksikköä kohti näin pidentäen sen rakennetta. Modifikaatiolla on todettu olevan lupaavia vaikutuksia molekyylin ominaisuuksiin ja sen terapeuttiseen potentiaaliin. Se pidentää molekyylin puoliintumisaikaa elimistössä merkittävästi ja siten myös kuduskertymä moninkertaistuu. Hiirikokeissa exNA-siRNA ei aktivoinut elimistön immuunijärjestelmää eikä se aiheuttanut off-target vaikutuksia. Parhaita tuloksia saatiin liittämällä exNA-modifikaatio jo käytössä oleviin modifikaatioihin.

Tehostuneet farmakokineettiset ominaisuudet avaavat oligonukleotiditerapioille mahdollisuuden kohdentaa hoidot maksan ulkopuolisiin kudoksiin. exNA-siRNA:ta voidaan mahdollisesti hyödyntää esimerkiksi sydämessä tai keskushermostossa. Tutkijoiden mukaan modifikaatiota voidaan hyödyntää myös muissa oligonukleotidipohjaisissa tekniologioissa, kuten CRISPR-ohjain-RNA:ssa. Tulevaisuudessa paremmat oligonukleotiditerapiat voivat mahdollistaa turvallisemmat, tarkemmat ja yksilöllisemmät hoitomuodot. Tällä hetkellä exNA-modifikaation tutkimus on vasta aluillaan, mutta sen potentiaali vauhdittaa teknologian kehitystä tulevaisuudessa.

Avainsanat: terapeuttiset oligonukleotidit, siRNA, exNA-modifikaatio, farmakokinetiikka, nukleasiresistenssi, oligonukleotiditerapia, sokeri-fosfaattirunko, fosforoamidiitti

Sisällys

1	Johdanto	1
2	RNA-interferenssi ja siRNA	2
2.1	RNA-interferenssin toimintamekanismi	2
2.2	siRNA:n kulkeutuminen elimistössä	2
2.3	siRNA-pohjaisten terapioiden haasteet.....	3
3	exNA–siRNA ja sen synteesi	6
3.1	exNA-modifikaatio	6
3.2	exNA–siRNA:n synteesi	6
3.2.1	exNA-fosforamidiittien synteesi	6
3.2.2	Oligonukleotidiketjun synteesi	8
3.3	exNA-modifikaation ominaisuudet	8
3.3.1	Sulamislämpö	8
3.3.2	Nukleaasikestävyys	9
3.3.3	Farmakokinetiikka ja kudoksiin kertyminen	10
3.3.4	Ominaisuuksien haasteet	11
4	Sovellukset ja tulevaisuuden näkymät	11
5	Yhteenveto	13
6	Viitteet	14

Lyhenteet

siRNA = Pieni häiritsevä RNA, engl. Small interfering RNA

mRNA = Lähetti-RNA, engl. Messenger RNA

tRNA = Siirtäjä-RNA, engl. Transfer RNA

dsRNA = Kaksinauhainen RNA, engl. Double-stranded RNA

RNAi = RNA-interferenssi

exNA = Pidennetty nukleiinihappo, engl. Extended nucleic acid

Ago2 = Argonautti-2-proteiini

PS = Fosforotioaatti, engl. Phosphorothioate

GalNaC = *N*-asetyyligalaktosamiini

DMTr = Dimetoksitrietyyli

TBDMS = *Tert*-butyylidimetyylisilyyli

TBDPS = *Tert*-butyylidifenyylisilyyli

MEM = Metoksietoksimetyyli

1 Johdanto

Kiinnostus oligonukleotidien terapeuttisiin ominaisuuksiin geneettisten sairauksien hoidossa on kiihdyttänyt niiden tutkimusta viimeisen vuosikymmenen aikana. Niiden terapeuttinen teho perustuu lääkkeen spesifiseen sitoutumiseen geeniä koodaavaan lähetti-RNA-juosteeseen. Oligonukleotidilääkkeet eivät kuitenkaan ole ongelmattomia. Ne ovat herkkiä seerumille ja solunsisäisille nukleaaseille, niiden kulkeutuminen on hankalaa sekä ne ovat herkkiä aktivoimaan elimistön immuunijärjestelmän. Näiden asioiden vuoksi oligonukleotidit pääsevät huonosti kohdesoluun ja niiden terapeuttinen teho on heikko. Näitä haasteita on pyritty ratkomaan muokkaamalla oligonukleotidien rakennetta sellaiseksi, mikä parantaisi niiden lääkeominaisuuksia.¹

Yksi oligonukleotidilääkkeiden osa-alue on keskittynyt pieniin häiritseviin RNA-juosteisiin, joita kutsutaan siRNA:ksi. Ne ohjaavat kohdesolun koneiston tuhoamaan tietyt lähetti-RNA-juosteet, mikä taas estää sairauteen liittyvän proteiinin synteesin. Yleisellä tasolla solussa geenejä vaimentavaa toimintaa kutsutaan RNA-interferenssiksi (RNAi). siRNA:t ovat noin 21 nukleotidin mittaisia juosteita.²

Myös siRNA:n tehokkuutta ja kestävyyttä on pyritty parantamaan rakenteen modifikaatioilla, mistä yksi on exNA-modifikaatio (engl. *extended nucleic acid*). Modifikaatiossa nukleosidiin lisätään metyleeniryhmä, mikä pidentää molekyylin runkoa. Tällä lisäyksellä on suoraan vaikutusta molekyylin ominaisuuksiin, ja se on lisännyt siRNA-pohjaisten lääkkeiden potentiaalia hoidoissa.¹

On myös olemassa muita siRNA-modifikaatioihin perustuvia lääkeaineita, joista ainoa markkinoille hyväksytty runkomodifikaatio on fosforotioaatti (PS). PS-modifioidut siRNA-lääkkeet vaikuttavat lähes yksinomaan maksaan. Tarve myös muille mahdollisille modifikaatioille on olemassa. siRNA:n rakennetta muokkaavia modifikaatioita on lukuisia erilaisia, mutta pääasialliset terapioissa hyödynnettävät modifikaatiot voidaan jakaa sokeriosan modifikaatioihin ja runkomodifikaatioihin.¹

Tässä tutkielmassa perehdytään siRNA:han tehtäviin modifikaatioihin, erityisesti runkomodifikaatio-exNA:han. Ensin käsitellään siRNA:n toimintamekanismeja sekä haasteita. Sitten käydään läpi, miten modifikaatiot vaikuttavat siRNA:n ominaisuuksiin ja miten niitä valmistetaan. Lopuksi käydään läpi modifioidun siRNA:n sovelluksia sekä tulevaisuuden näkymiä.

2 RNA-interferenssi ja siRNA

2.1 RNA-interferenssin toimintamekanismi

RNA-interferenssin eli RNAi:n perusidea on, että lyhyiden komplementaaristen RNA-molekyylien avulla pystytään vaikuttamaan geenien ilmentymiseen. Tämä johtaa mRNA:n pilkkoutumiseen ja translaation estymiseen.³ RNAi on monille organismeille välttämätön tapahtuma, esimerkiksi kasvien virustorjunnassa sekä nisäkäseläimien solujen toiminnoissa. Kasvit käyttävät omaa RNAi-koneistoaan osana immuunipuolustusjärjestelmäänsä tunnistamaan ja tuhoamaan vierasta virus-RNA:ta. Myös nisäkkäillä se osallistuu virustorjuntaan, minkä lisäksi sitä hyödynnetään geenien ilmentymisen säätelyssä, sikiökehityksessä sekä transposonien hallinnassa.^{4,5}

RNAi käynnistyy, kun soluun saapuu kaksijuosteista RNA:ta (dsRNA). Tämä pilkkoutuu Dicer-entsyymien avulla lyhyempiin juosteisiin, jotka sitoutuvat RISC-proteiinikompleksiin (engl. *RNA-induced silencing complex*). Samalla dsRNA:n toinen juoste poistetaan. Kompleksin avainproteiinina toimii Argonaute (Ago2). RISC-proteiinikompleksi käyttää lataamaansa jäljelle jäänyttä antisense-juostetta löytääkseen komplementaarisen mRNA:n. Kun kohde-mRNA on löytynyt, se pilkkoutuu ja lukeminen estyy. Seurauksena kyseisen geenin ilmeneminen vaimenee tai estyy kokonaan (Kuva 1).

6

2.2 siRNA:n kulkeutuminen elimistössä

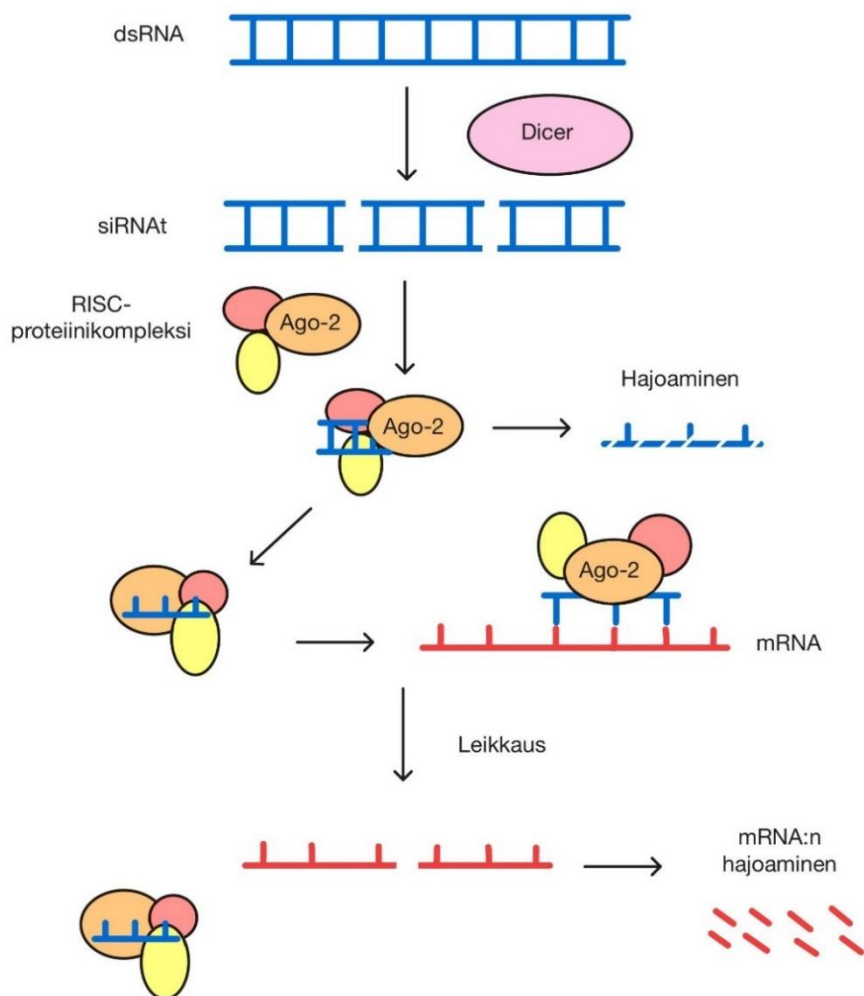
Tehokas siRNA:n kulkeutuminen soluun edellyttää lääkeainevektoreiden käyttöä. Viraalisissa menetelmissä vektorina toimii virus. Ei-viraalisissa menetelmissä siRNA konjugoidaan esimerkiksi polymeereihin, lipideihin ja peptideihin. Niiden etuna on helpompi synteesi ja skaalattavuus. On myös olemassa yhdistelmämenetelmiä, joissa useamman eri vektorien ominaisuuksia hyödynnetään samanaikaisesti.⁷

Kuljetusmenetelmissä hyödynnetään molekyylien varauksellisia eroja, kuten negatiivisesti varautuneen siRNA-molekyylin sitoutumista kationisiin polymeereihin. Polymeerivektoreita hyödynnetään myös niiden suojaavan vaikutuksen ja laaja-alaisen muokattavuuden vuoksi. siRNA-polymeerikompleksi kulkeutuu solun endosomeihin, ja vektori on suunniteltu hajottamaan endosomin rakenne. Näin siRNA vapautuu solulimaan ja pääsee toimimaan solussa.⁸

Lipidipohjaiset vektorit ovat yksi vanhimmista ja kliinisesti käytetyimmistä kuljetusmenetelmistä. Niihin sisältyvät esimerkiksi misellit ja liposomit, joiden etuna on niiden bioyhteensopivuus elimistön rakenteiden kanssa.⁷ Lipidivektorit toimivat samankaltaisesti polymeerivektoreiden tavoin

hyödyntämällä sähköisiä vuorovaikutuksia, suojaamalla siRNA:ta ja hajottamalla endosomin kalvon.
9

Peptidejä hyödynnetään vektoreina erityisesti niiden soluspesifisen kulkeutumisen ja tehokkaan kalvokuljetuksen vuoksi. Myös peptidi-oligonukleotidikonjugaatin hyvä vakaumus on sen merkittävä etu. Etenkin soluun tunkeutuvat peptidit (*engl. cell-penetrating peptide, CPP*) sekä kalvoja hajottavat peptidit (*engl. membrane-permeabilizing peptide, MPP*) ovat potentiaalisia vektorikohteita.⁷



Kuva 1. Esitys siRNA:lla tapahtuvasta RNAi:sta. Mukailtu viitteestä [6]. Kaksijuosteinen RNA muokataan Dicer-entyymin avulla siRNA:ksi, mikä kiinnittyy RISC-proteiinikompleksiin. Ago2-nukleaasi pilkkoo sense-juosteen, jolloin jäljelle jäänyt antisense-juoste toimii kompleksissa ohjaajana komplementaarisen mRNA-sekvenssin löytämiseksi. RISC leikkaa ja hajottaa mRNA:n, mikä johtaa proteiinisynteesin estymiseen ja siten geenin ilmentymisen hiljenemiseen.

2.3 siRNA-pohjaisten terapioiden haasteet

Vaikka siRNA:lla on ominaisuuksiensa puolesta merkittävää terapeutista potentiaalia, on sillä monia heikkouksia. Näitä haasteita pyritään ratkaisemaan kemiallisilla modifikaatioilla, jotka tuovat

molekyylille edullisia ominaisuuksia. Oligonukleotideihin voidaan tehdä kemiallisia modifikaatioita monessa eri pääluokassa: sokeri-, fosfaatti- ja emäsosaan sekä molekyylin päihin sekä liittämällä siihen erilaisia konjugaatteja.¹⁰

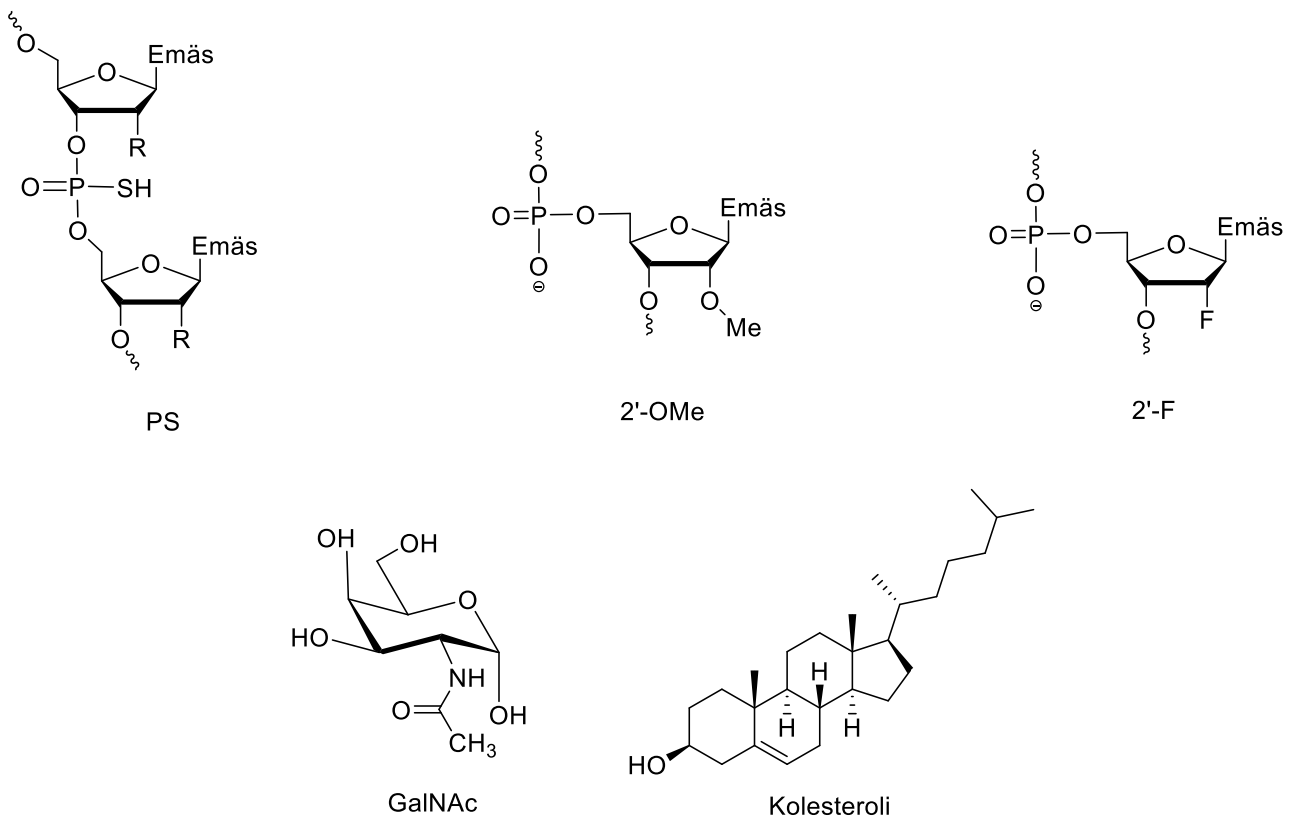
Ylivoimaisin haaste on siRNA:n kulkeutumisen biologiset esteet. Molekyyli on elimistössä yksinään epästabiili koska se on altis hajoamiselle nukleaasien vaikutuksesta. Vaikka pääsy kohdesolulle onnistuisi, siRNA:n negatiivinen varaus ja molekyylin suuri koko vaikeuttavat sen läpäisyä solukalvon läpi. Viimeisenä merkittävänä biologisena esteenä on endosomaalinen pako, jossa vain osa siRNA:sta pääsee ulos solulimaan endosomista.¹¹ Yksi käytetyimmistä siRNA-modifikaatioista, standardina toimiva fosforotioaatti (PS) -modifikaatio, vastaa osittain näihin haasteisiin (Kuva 2). Modifikaatioissa nukleotidien välistä fosfodiesterisidosta muokataan vaihtamalla happiatomi, joka ei muodosta sidoksellisia siltoja, rikkiatomilla. Tämä muokkaus vaikuttaa suoraan nukleaasien heikentyneeseen kykyyn tunnistaa molekyyli ja ohjata se hajoitettavaksi. PS-modifioidut siRNA:t myös kulkeutuvat tehokkaammin kohdekudokseensa.^{1,12} Toinen modifikaatioryhmä, 2'-sokerimodifikaatiot, pyrkivät vastaamaan siRNA-lääkkeiden biologisiin haasteisiin. Niistä yleisimmät ovat 2'-*O*-metyyli (2'-OMe) sekä 2'-fluori (2'-F) (Kuva 2). RNA-molekyylin riboosisokerissa on 2'-asemassa normaalisti hydroksyyli-ryhmä, joka on siis korvattu elektroneja puoleensavetävillä ryhmillä. Nämä modifikaatiot eivät ainoastaan paranna molekyylin nukleasiresistenssiä vaan myös säilyttävät sokeriosan edullisessa konformaatioissa (3'-endo-konformaatio). Tämä on tärkeää, sillä rakenne on kriittinen siRNA:n kaksoiskierteen A-muodon muodostumisen kannalta. Tämä konformaatio puolestaan mahdollistaa rakenteen tehokkaan tunnistamiseen ja hyödyntämiseen RISC-koneistossa.¹³

Kemialliset muokkaukset siRNA:n rakenteeseen pyrkivät lisäämään molekyylin stabiiliutta ja affiniteettia kohde lähetti-RNA-juosteeseen, mutta haasteena voi olla mahdolliset väärin samankaltaisten geenien hiljentämiset eli niin kutsutut off-target-vaikutukset, jotka voivat aiheuttaa odottamattomia ja haitallisia sivuvaikutuksia.¹¹

Kuten mainittu, siRNA-molekyylit kulkeutuvat huonosti kohdekudoksiin ja geenien hiljentämisen teho on suhteellisen heikkoa. Ongelman ratkaisuksi on löydetty konjugaatiomodifikaatioita, joissa siRNA-molekyyliin lisätään toinen molekyyli (ligandi). Modifikaatiolla pyritään parantamaan täsmäohjausta ja soluläpäisyä, jotta lääkkeen geenien hiljentämisen teho paranee. Yksi konjugaatiomodifikaatioiden varhaisin ja eniten hyödynnetty alaluokka on lipidikonjugaatiot, etenkin kolesterolin hyödyntäminen ligandina (Kuva 2). Niiden päätavoitteena on lisätä siRNA-molekyylin lipofiilisyyttä. Kolesterolin liittäminen sai siRNA-ligandi-molekyylin sitoutumaan elimistön lipoproteiineihin, jotka toimivat luonnollisina kuljettimina. Rasvaliukoisena molekyylinä kolesteroli

myös tehosti siRNA:n kulkeutumista solun sisään.^{14,15} Ligandien avulla voidaan kohdentaa molekyylin kulkeutuminen myös tiettyihin soluihin ja kudoksiin. Maksan tapauksessa merkittävä esimerkki reseptorikohdennetusta kuljetuksesta on *N*-asetyyligalaktosamiini eli GalNAc (Kuva 2). Se on galaktoosin aminosokerijohdannainen, joka sitoutuu voimakkaasti ja spesifisesti maksasolujen asialoglykoproteiinireseptoreihin (ASGPR). Tämä spesifi ja tehokas menetelmä on johtanut siihen, että GalNAc-ligandi on käytössä monissa FDA:n hyväksymässä siRNA-rakenteissa, esim. givosiraani-lääkkeessä.^{16,17}

siRNA voi laukaista myös elimistön immuunipuolustuksen, jolloin tulehdusreaktio heikentää hoidon terapeutista vaikutusta. Immunogeenisyyden vähentäminen on 2'-OMe modifikaation vahvuus, sillä se estää molekyylin tehokkaan sitoutumisen elimistön tunnistusreseptoreihin.¹⁸ Myös siRNA-molekyylien pieni koko edistää niiden nopeaa puoistumista verenkierrosta, mikä lyhentää niiden vaikutusaikaa elimistössä.⁶

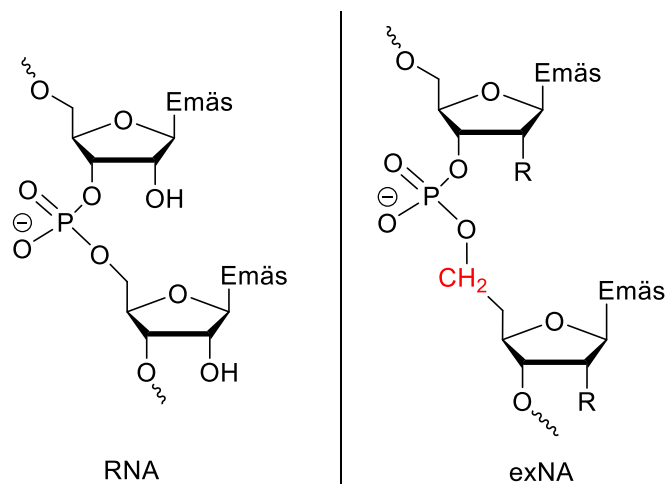


Kuva 2. Yleisimmät siRNA-molekyylin modifikaatit. Mukailtu viitteistä [1],[13],[15] ja [19].

3 exNA–siRNA ja sen synteesi

3.1 exNA-modifikaatio

Yksi uusi siRNA:n rakenteen modifikaatio on exNA (engl. *extended nucleic acid*, laajennettu nukleiinihappo), missä nukleosidin 5'-hiilen ja 5'-hydroksyyliiryhmän väliin lisätään metyleeniryhmä. Se on suunniteltu pysyväksi muutokseksi RNA:n rakenteeseen, ja sen tavoitteena on mahdollistaa lääkkeen kohdentaminen myös muihin kudoksiin kuin maksaan. Markkinoilla olevat siRNA-pohjaiset lääkkeaineet kohdistuvat maksakudokseen, sillä lääkkeen kohdentaminen GalNAc-konjugaation avulla on tehokasta. Lääkkeen kulkeutuminen sekä kertyminen maksanulkoisiin kudoksiin vaatisi tehostunutta stabiiliutta sekä parempia kuljetusmenetelmiä. exNA:n yhdistäminen myös muihin siRNA:n modifikaatioihin on tehostanut molekyylin haluttuja ominaisuuksia.¹



Kuva 3. Tavanomaisen RNA:n rakenteen ja exNA-modifikaation ero. Mukailtu lähteestä [1].

Modifikaatiossa molekyyliin lisätään metyleeniryhmä 5'-hiileen, mikä pidentää sen rakennetta.

3.2 exNA–siRNA:n synteesi

Metyleenisillan lisääminen oligonukleotideihin tapahtuu monivaiheisen reaktioketjun kautta. Ensin tulee valmistaa ”rakennusyksiköt”, joista pystytään myöhemmin kokoamaan haluttu nukleotidiketju. Rakennusyksiköinä toimii exNA-fosforamidiitit, joita pystytään valmistamaan synteettisesti kaupallisista molekyyleistä. Fosforamidiitit sisältävät nukleosidin, suojaryhmän sekä reaktiivisen kolmen arvoisen fosforiryhmän.¹⁹ Lopullinen ketju valmistetaan automatisoidulla syntetisaattorilla syklisesti toistaen neljää työvaihetta. Lopuksi syntetisoitu exNA-siRNA vapautetaan ja puhdistetaan.¹

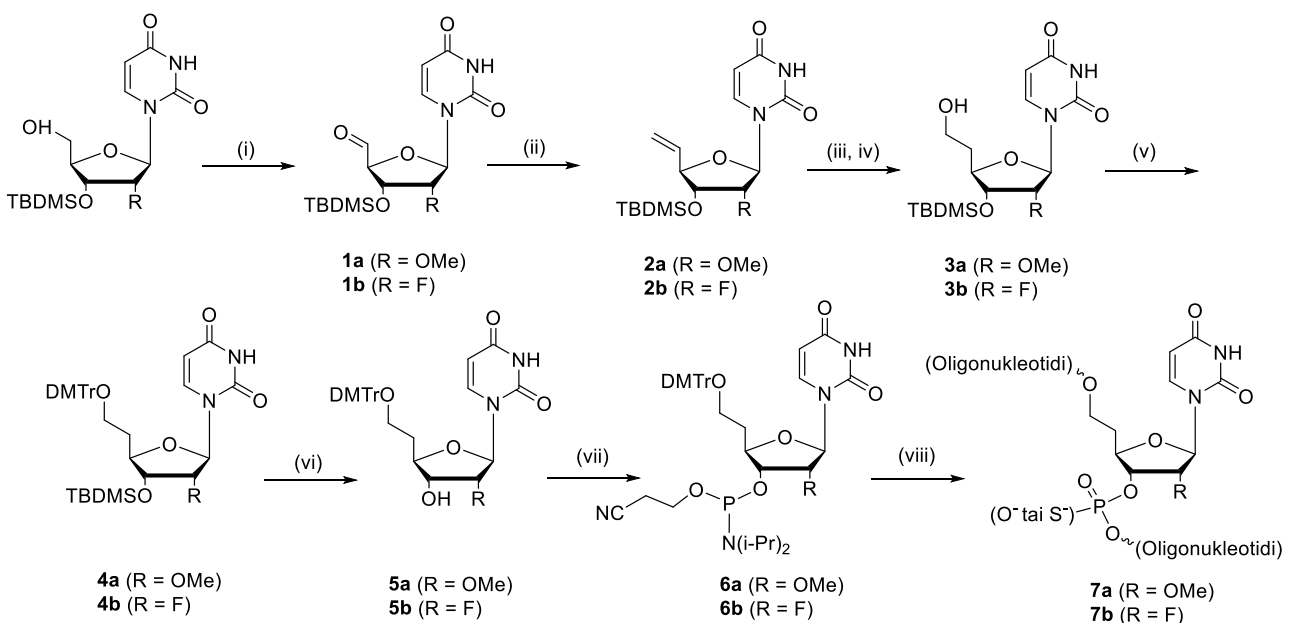
3.2.1 exNA-fosforamidiittien synteesi

Ennen RNA-ketjun synteesiä on välttämätöntä muodostaa nukleosidit, jotka toimivat RNA-molekyylin rakennusyksiköinä. Sokeriosaa, riboosia, muokataan 2'-OMe- tai 2'-F-modifikaatioilla.

Nämä muokkaukset ovat käytössä lääkenällisesti hyväksytyissä siRNA-lääkkeissä, koska ne toimivat yhdessä ihmisen Ago2-proteiinin kanssa ja lisäävät aineenvaihdunnallista kestävyyttä. Lisäksi riboosin 3'-hydroksyyliiryhmä suojataan joko TBDMS (tert-butyylidimetyylisilyyli)- tai TBDPS(tert-butyylidifenyylisilyyli)-ryhmällä (Kaavio 1).¹

Ensimmäinen vaihe nukleosidin rungon pidentämiseksi alkaa 5'-pään dimetoksitriitylin (DMTr) -suojausten poistamisella. Syntynyt vapaa 5'-hydroksyyliiryhmä hapetetaan katalyytillä aldehydiksi. Hiiliketjun pidennys suoritetaan Wittig-reaktiolla aldehydin reagoissa Wittig-reagenssin kanssa. Tämä reaktio liittyy ketjuun uuden hiiliatomin samalla luoden vinyyliryhmän eli hiili-hiilikaksoissidoksen. Seuraavassa osassa tapahtuu hapetus, mikä on avainasemassa exNA-rakenteen saavuttamiseksi. Siinä vinyyliryhmä käsitellään hydroboraatioreagenssilla 9-BBN (9-borabisyklononaani), jonka jälkeen se hapetetaan. Tämän kaksivaiheisen reaktion tuloksena nukleosidin rakenteeseen syntyy uusi metyleenisilta, joka perustuu vinyyliryhmän vaihtumiseen hydroksyyliiryhmäksi. Näin saadaan pidempi exNA-nukleosidi (Kaavio 1).¹

Lopuksi muokataan nukleosidin suojaryhmiä ja tehdään siitä sopiva automaattiseen nukleotidisynteesiin. Muodostunut hydroksyyliiryhmä suojataan DMTr-ryhmällä, mikä estää sitä reagoimasta myöhemmissä synteesivaiheissa. Myös alussa valittu 3'-hiilen TBDMS- tai TBDPS-suojaryhmä poistetaan. Synteesin viimeisessä vaiheessa tapahtuu fosforamidiitin muodostus. 3'-hydroksyyliiryhmään liitetään fosforamidiittiryhmä, jolloin fosfori-keskus toimii aktiivisena funktionaalisenä ryhmänä oligonukleotidiketjun fosfodiesterisidosten muodostuksessa (Kaavio 1).¹



Kaavio 1. exNA-fosforamidiittien synteesikuvaus. Mukailtu lähteestä [1].

Reagenssit ja olosuhteet: (i) IBX/asetonitrili, 85 °C, 1,5–2 tuntia. (ii) Metyylitriphenyylifosfoniumbromidi, kalium-tert-butoksidi, tetrahydrofuraani, 0 °C ja sen jälkeen huoneenlämpötilassa yön yli, 2a: 75 % (2 vaihetta), 2b: 67 % (2 vaihetta). (iii, hydroboraatio) 9-BBN, tetrahydrofuraani, 0 °C, yön yli. (iv, hapetus) Natriumperboraattitetrahydraatti, metanoli, tetrahydrofuraani, vesi, 0 °C ja sen jälkeen huoneenlämpötilassa yön yli, 3a: 62 % (2 vaihetta), 3b: N.D. (ei määritetty). (v) Dimetoksitriitylikloridi, pyridiini, huoneenlämpötilassa, 2 tuntia. (vi) 0,1 M tetrabutyyliammoniumfluoridi, tetrahydrofuraani, huoneenlämpötilassa, 1 tunti, 5a: 93 % (2 vaihetta), 5b: 12 % (3 vaihetta). (vii) 2-syanoetyyli-N,N-diisopropyylikloorifosforamidiitti, DIPEA, dikloorimetaani, 0 °C ja sen jälkeen huoneenlämpötilassa, 0,5 tuntia, 6a: 86 %, 6b: 81 %.

3.2.2 Oligonukleotidiketjun synteesi

Spesifinen siRNA-ketju voidaan syntetisoida syklisesti exNA-fosforamidiitti-nukleotideista automaattisella syntetisaattorilla. Sykli koostuu neljästä toistuvasta vaiheesta ja niitä toistetaan, kunnes halutun pituinen ja emäsjärjestykseltään oikea oligonukleotidi on valmis. Prosessi toimii kiinteän kantajan menetelmällä eli kasvava ketju kiinnitetään kiintokantajaan koko synteessin ajaksi. Syklin ensimmäisessä vaiheessa poistetaan happoa hyödyntäen nukleosidin DMTr-suojaryhmä, jolloin ketjun pään hydroksyyli-ryhmä vapautuu seuraavaa vaihetta varten. Toisessa vaiheessa tapahtuu kytkeä, jolloin reaktoriin johdettu uusi nukleosidifosforamidiitti liitetään vapautuneen ketjun päähän. Tällä tavalla ketju kasvaa aina yhden nukleotidin verran. Kolmannessa vaiheessa mahdolliset reagoimattomat ketjut asetyloidaan. Tämä estää virheellisten lyhyempien sekvenssien syntymisen lopputuotteeseen.¹ Viimeisessä vaiheessa tapahtuu hapetus tai rikitys (oxidation/sulfurization), mikä muokkaa muodostuneita sidoksia vakaammiksi. Hapettamalla syntyy fosfodiesterisidos (PO-sidos) ja rikittämällä fosforotioaattisidos (PS-sidos). Menetelmän valinta riippuu ketjun ominaisuuksien valinnasta. Synteesisykli toistetaan, kunnes haluttu oligonukleotidirakenne on saavutettu. Seuraavaksi ketju irrotetaan kiintokantajasta ja jäljellä olevat suojaryhmät poistetaan. Puhdistuksen jälkeen syntetisoitu exNA-juosteet ovat käyttövalmiit kokeellisiin ja terapeuttisiin tarkoituksiin.¹

3.3 exNA-modifikaation ominaisuudet

Kuten mainittu, oligonukleotidien modifikaatioilla pyritään parantamaan niiden kestävyyttä ja terapeuttisia ominaisuuksia. Etenkin exNA:n tavoitteena on parantaa siRNA:n kestävyyttä eksonukleaaseilta sekä pystyä kohdentamaan siRNA:n myös maksanulkoisiin kudoksiin.¹

3.3.1 Sulamislämpö

Toimiakseen muokatun exNA-siRNA:n kaksoiskierteen tulee pysyä kasassa, mutta toisaalta avauduttava oikealla hetkellä. Tätä testattiin lämpöstabiilisuustesteillä, jossa hyödynnettiin 11 nukleotidin pituista sekvenssiä joka sisälsi yhden exNA-modifioidun nukleotidin. Tuloksena modifioidun RNA:n sulamislämpötila oli lähes aina alhaisempi kuin perinteisen RNA-molekyylin.¹

Täysin komplementaarisen RNA-RNA-kaksoiskiirteen kanssa sulamislämpötila laski 3 °C ja täysin komplementaarisen RNA-DNA-kaksoiskiirteen kanssa 8 °C. Tulokset siis näyttävät, että modifikaatio teki kaksoiskiirteestä termodynaamisesti epästabiilimman. Vaikka exNA-siRNA avautuu hieman helpommin lämmön vaikutuksesta, ei se ole suuri ongelma. Myös muiden toimivien siRNA-modifikaatioiden kohdalla ollaan todettu vastaavaa termodynaamista epävakautta ja oligonukleotidilääkkeissä kestävyuden kannalta on merkittävämpää molekyylin resistanssi elimistön nukleaaseja vastaan.¹

Toisessa varhaisemmassa tutkimuksessa syntetisoitiin fosfaattisidoksesta modifioitu oligonukleotidi lisäämällä nukleotidin sokeriosan 3'-hiileen hiiliatomi hydroksimetyyliryhmällä.²⁰ Saman molekyylin lisättiin sokerin 2'-hiileen metoksietoksimetyyliryhmä (MEM), jotta molekyylin kolmiulotteinen rakenne olisi suotuisampi sitoutumiselle kohde-RNA:han. Kuten 5'-muokatussa exNA:ssa, modifikaatio pidensi molekyylin rakennetta ja lisäsi nukleotidien välistä etäisyyttä. Tutkijoilla oli samat hypoteesit kuin aikaisemmassa tutkimuksessa: modifikaatio parantaisi molekyylin sitoutumista kohde-RNA:han ja se olisi kestävämpi. Havaittiin, että muokkaus kuitenkin heikensi oligonukleotidin kykyä sitoutua kohteeseensa. Tämä näkyi suoraan sulamislämmön (T_m) alenemana, mikä on yhtenevä tulos exNA-siRNA tutkimuksen kanssa. Tutkijat päättelivät myös MEM-ryhmän aiheuttavan destabiloivaa steeristä estettä, joka esti kaksoiskiirteen muodostumisen.²⁰

3.3.2 Nukleasikestävyys

Suurin modifikaation tuottama ominaisuus siRNA:lle on huomattavasti parantunut kestävyys nukleaaseille. Eksonukleasit ovat entsyymejä, jotka hajoittavat nukleiinihappoja pilkkomalla nukleotideja ketjun päästä yksi kerrallaan. Elimistössä molekyylin kestävyyttä vaarantaa eniten 5'- ja 3'-eksonukleasit, jotka hajoittavat kaksijuosteista RNA-molekyyliä eri päistä. Oligonukleotidilääkkeiden suurin haaste elimistössä on molekyylin 3'-pään hajoaminen 3'-eksonukleasien toimesta. Nukleasiresistenssiä tutkittiin 20-meerisillä oligonukleotideilla, jossa 3'-pään kaksi viimeistä nukleotidia oli exNA-modifioituja uridiineja. Itsenäisesti exNA-modifikaatio paransi kestävyyttä merkittävästi verrattuna yleisesti käytettyyn PS-modifikaatioon, jolloin puoliintumisaika oli noin 9 tuntia 1,1 tunnin sijasta.¹ Kun nämä kaksi modifikaatiota yhdistettiin, puoliintumisaika oli jopa 32 tuntia. Tuloksena siis exNA-PS-yhdistelmämodifikaatio oli 32-kertaa kestävämpi 3'-eksonukleaseja vastaan kuin pelkkä PS-modifikaatio ja yli 1000 kertaa kestävämpi kuin muokkaamaton siRNA.

Kun taas tutkittiin molekyylin kestävyyttä 5'-eksonukleaseja vastaan, saatiin kaksi havaintoa. Pelkkä PS-modifikaatio on tehokas suojaamaan molekyylin 5'-päästä, eikä siihen verrattuna exNA-

modifikaation lisääminen ketjun ensimmäiseen nukleotidiin parantanut kestävyyttä merkittävästi. Kuitenkin modifikaation lisääminen toiseen nukleotidiin ketjun alusta antoi yhtä tehokkaan suojan nukleaaseja vastaan kuin PS-modifikaatio.¹

Jotkut modifikaatiot häiritsevät nukleaasien toimintaa mutta exNA estää niiden sitoutumisen, jolla on tehokkaampi vaikutus kestävyyteen. Toisaalta modifikaatioiden yhdistäminen luo tilanteen, jossa molemmat vaikutukset yhdistyvät. Tuloksena modifikaatioiden yhdistelmä lisää molekyylin elinikää elimistössä huomattavasti. Myös ainoastaan exNA:n lisääminen molekyyliin lisää sen kestävyyttä ja sitä voidaan käyttää myös itsenäisesti.¹

Toisessa tutkimuksessa muokattiin oligonukleotideja vaihtamalla fosforidiesterisidos fosfonaattisidokseen, jolloin ribosisokerin 3'- tai 5'-aseman happi vaihdettiin metyleeniryhmäksi.²¹ Se on siis lähellä exNA-modifikaation rakennetta ja sillä on myös yhteneviä tuloksia nukleaasikestävyyteen. Verrattuna muokkaamattomaan RNA:n hajoamiseen alle minuutissa fosfonaattimuokatut RNA-pätkät kestivät tutkitun kahden tunnin ajan nukleaasien läsnäollessa. Voidaan siis todeta, että RNA-molekyylien sokerifosfaattirungon muokkaukset, exNA ja fosfonaatit, onnistuivat lisäämään RNA:n kestävyyttä nukleaaseja vastaan.²¹

3.3.3 Farmakokinetiikka ja kudoksiin kertyminen

Tutkimuksissa *in vivo* hyödynnettiin hiiriä ja seurattiin exNA-siRNA:n käyttäytymistä niiden elimistössä. Hiirikokeiden tuloksena exNA-modifioitu siRNA osoitti plasmassa noin kolminkertaisen huippupitoisuuden (C_{max}), kuusinkertaisen kokonaisaltistuksen (AUC) ja viipyi verenkierrossa keskimäärin kaksi kertaa kauemmin kuin muokkaamaton siRNA.¹ Tämän lisäksi kertyminen kudoksiin oli tehostunut ja parin viikon kuluttua pistoksesta sitä löytyi erityisen paljon etenkin sydäimestä, maksasta ja rasvasta. Modifikaatio siis paransi merkittävästi molekyylin farmakokinetiikkaa ja kertymistä kudoksiin verrattuna PS-modifikaatioon. Tämä kaikki oli seurausta molekyylin pidentyneestä eliniästä verenkierrossa tehostuneen nukleaasikestävyuden vuoksi.¹

Modifikaation hyödyt ulottuivat myös keskushermostoon. exNA-modifikaatio tehosti hiirillä siRNA:n toimintaa myös aivoissa ja selkäytimessä, koska modifikaatiolla saavutettiin huomattavasti parempi geenien hiljeneminen tutkituilla aivoalueilla ja vaikutusaika oli pidempi. Tämä tulos avaa oligonukleotidien potentiaalisen lääkennällisen hyödyntämisen myös neurologisiin terapioihin.¹

Modifikaation lisäämisen tiettyyn kohtaan molekyyliä vaikuttaa sen koko ominaisuuksiin ja sitoitumiseen Ago2-proteiiniin. Muokkauksen sijainti on siis ratkaiseva haluttujen ominaisuuksien

kannalta. Kun exNA-modifikaatio sijoitettiin 3'-päähän, se suojaasi sitä nukleaaseilta vaikuttamatta geenien hiljentämisen tehokkuuteen. Toisaalta kun muokkaus tehtiin molekyylin 5'-päähän eli kohteen tunnistamisen ”siemenalueelle”, häiritsi se normaalia toimintaa ja vähensi siRNA:n tehoa, sillä se häiritsi sitoutumista kohdegeeniin.¹

3.3.4 Ominaisuuksien haasteet

Toisaalta uudet ominaisuudet tuovat myös haasteita. Tutkimus on vasta varhaisessa vaiheessa ja toteutettu *in vitro* tai hiirikokeilla, eikä sen vaikutuksia ihmiskehoon vielä tunneta. Tehostunut kuduskertymä voi osoittautua ongelmaksi tilanteessa, jossa ilmenee haittavaikutuksia ja lääkettä on hankalaa lopettaa vaikuttamasta. Toisaalta myös kertyminen ei-kohdekudoksiin lisää pitkittynyttä altistusta lääkkeelle. Tuntemattoman vasteen lisäksi exNA:n liittäminen PS-modifikaatioon voi mahdollisesti lisätä tai muuttaa elimistön komplementtijärjestelmää. Se on synnynnäinen vahva proteiineihin perustuva osa immuunijärjestelmää, joka voi aktivoitua PS-modifioitujen terapioiden sivuvaikutuksena aiheuttaen vahvan tulehdusreaktion elimistössä.²²

Yhteenvedon voidaan todeta exNA-modifikaation parantavan merkittävästi siRNA:n ominaisuuksia lisäten sen terapeuttista potentiaalia. Parempi stabiilius ja tehostunut kertyminen kudoksiin johtaa geenien tehokkaampaan hiljentymiseen ja mahdollistaa hoidot maksan ulkopuolisiin kudoksiin. Modifikaatiota pystytään tuottamaan synteettisesti ja se sopii biologisiin systeemeihin. Se voidaan liittää myös muihin oligonukleotidipohjaisiin sovelluksiin, kuten CRISPR-ohjain-RNA:han ja antisense-oligonukleotideihin, kasvattaen sen potentiaalia entisestään.¹

4 Sovellukset ja tulevaisuuden näkymät

RNA-interferenssiin pohjautuvia lääkkeitä on saatu vähitellen markkinoille ja ne kehittyvät kemiallisten modifikaatioiden seurauksena. Modifikaatiot parantavat lääkkeiden farmakokinetiikkaa ja vähentävät immunogeenisyyttä. Kaikki terapioissa hyödynnetyt lääkkeet kohdistuvat maksaan ja suurin siRNA-pohjaisten lääkkeiden tavoite on kehittää muihin kudoksiin pohjautuvia kulkeutumismenetelmiä. Tällä teknologialla on potentiaalia perinnöllisten tautien, syövän, sydän- ja verisuonitautien sekä neurologisten sairauksien hoidossa. Teknologian kehitys, kuten entsyymattainen synteesi ja tekoälyn hyödyntäminen, nopeuttavat kehitystä entisestään. Vaikka monet lääkkeet ovat edelleen tutkimusvaiheessa, siRNA-terapioiden odotetaan saavuttavan merkittävän aseman lääkemarkkinoilla tulevaisuudessa.²³

Erityisesti exNA-modifikaation tuoma siRNA-molekyylin vakaus ja tehostunut kudoksiin kertyminen lisäävät sen terapeuttista potentiaalia merkittävästi. Nämä ominaisuudet avaavat lääkkeelle mahdollisuuden toimia munuaisissa, keskushermostossa, lihaksissa ja rasvassa. Lupaavaa on myös exNA-modifioitujen siRNA-molekyylin yhdistäminen kohdennettuihin kuljetusmenetelmiin, kuten lipidikonjugaatteihin. exNA:n ollaan todettu myös olevan yhteensopiva nykyisten valmistusmenetelmien kanssa ja sen synteesi on skaalattavissa. Näiden tekijöiden lisäksi myös modifikaation yhdistäminen jo terapioissa hyödynnettäviin modifikaatioihin tekee siitä potentiaalisen lisän jo olemassa olevien lääkkeiden rinnalle.¹

exNA-modifikaatio on uusi tutkimuskohde ja sen tutkimus on vasta alkutekijöissään. Pitkällä aikavälillä modifikaatioon pohjautuvat terapiat voivat eliminoida nykyisten terapioiden haittavaikutuksia sekä muodostaa perustan entistä tehokkaammille, tarkemmille sekä yksilöllisemmille siRNA-terapioille. Tutkijat spekuloiivat exNA-modifikaation potentiaalinen ylettyvän myös muihin oligonukleotidipohjaisiin strategioihin, kuten CRISPR-ohjain-RNA:han, antisense-oligonukleotideihin sekä mRNA- ja tRNA-hoitoihin.¹ exNA-modifioituja molekyyliä voitaisiin käyttää myös diagnostiikkatyökaluina, kuten esimerkiksi erittäin tarkkoissa nukleinihappojen tunnistuksessa.

Tulevaisuudessa exNA-modifioituja molekyyliä voitaisiin käyttää useissa käyttökohteissa. RNA:n runkorakenteita muokataan todennäköisesti entistä enemmän synteettisesti parempien ominaisuuksien toivossa. siRNA-lääkkeiden kulkeutuminen kohdekudoksiin tehostuu sopivampien modifikaatioiden sekä uuden sukupolven kuljettimien ansiosta. Tulevaisuudessa siRNA-lääkkeet voivat tarjota mahdollisuuksia myös harvinaisten geneettisten sairauksien hoitoon osana personoitua lääketiedettä. Tärkeimpänä tavoitteena on kuitenkin kehittää turvallisempia ja tehokkaampia lääkkeitä sekä terapioita.

5 Yhteenveto

siRNA-pohjaisten lääkkeiden kehittyminen on kiihtynyt viime vuosina ja ne ovat nousseet merkittäväksi tutkimuskohteiksi ja välineeksi geneettisten sairauksien hoidossa. Ne perustuvat RNA-interferenssiin, jossa siRNA-juoste ohjaa RISC-koneiston hajoittamaan kohde-mRNA:n. Teknologialla on merkittävää terapeutista potentiaalia juuri siksi, että siRNA-lääkkeet pureutuvat geneettisten sairauksien juurisyyhyn. Sillä on kuitenkin myös runsaasti haasteita, kuten heikko stabiilisuus ja farmakokinetiikka. Myös immuunijärjestelmän aktivointi sekä mahdolliset off-target-vaikutukset rajoittavat siRNA-tekniikan kliinistä hyödyntämistä.

Kyseisiä siRNA-tekniikan ongelmia on pystytty ratkaisemaan molekyylien kemiallisilla modifikaatioilla, jotka parantavat niiden ominaisuuksia. Laajalti hyödynnettyjä modifikaatioita ovat sokeri- ja fosfaattiosan modifikaatiot, kuten fosforotioaatti-modifikaatio. Viime vuosina ollaan tutkittu uudenlaista nukleotidin runkoa pidentävää modifikaatiota, exNA-modifikaatiota. Runkoa pidentävä muokkaus tapahtuu metyleeniryhmän lisäyksellä molekyylin selkärankaan, näin pidentäen sitä yhdellä hiiliatomilla. Tutkimustulokset osoittavat, että tämä exNA-modifikaatio lisää merkittävästi molekyylin kestävyyttä eksonukleaaseille, pidentää sen puoliintumisaikaa elimistössä sekä parantaa lääkkeen kulkeutumista kudoksiin. Hiirikokeissa exNA-modifioitujen siRNA-molekyylien ovat osoittaneet merkittävää terapeutista potentiaalia ja lääkkeen tehokasta kulkeutumista myös maksan ulkopuolisiin kudoksiin. Nämä tulokset mahdollistavat siRNA-hoitojen laajentamisen yhä useampiin kudoksiin, kuten sydämeen ja aivoihin.¹

siRNA-tekniikalla on laaja terapeutinen potentiaali perinnöllisten sairauksien hoidossa, johon ei aikaisemmin ole ollut tehokasta tai kestävä vaihtoehtoa. Tekniikka pureutuu sairauden juurisyyhyn tehden siitä tehokkaan ja täsmällisen terapian. Vaikka useat siRNA-terapiat ovat edelleen tutkimus- ja kehitysvaiheessa, ala kehittyy nopeasti ja uusia ideoita kehitetään jatkuvasti. Tehokkaita kehityskohteita ovat siRNA:n rakenteen kemialliset modifikaatiot sekä uudet kuljetusmenetelmät. Tämän perusteella siRNA-lääkkeiden merkitys odotetaan kasvavan merkittävästi tulevaisuudessa. Jatkuva tutkimus ja innovaatiot, kuten kemiallinen modifikaatio exNA, sekä kehittyvät kuljetustekniikat mahdollistavat entistä tehokkaampien ja turvallisempien RNA-pohjaisten terapioiden kehittämisen myös tulevaisuudessa.

6 Viitteet

- (1) Yamada, K.; Hariharan, V. N.; Caiazzi, J.; Miller, R.; Ferguson, C. M.; Sapp, E.; Fakih, H. H.; Tang, Q.; Yamada, N.; Furgal, R. C.; Paquette, J. D.; Biscans, A.; Bramato, B. M.; McHugh, N.; Summers, A.; Lochmann, C.; Godinho, B. M. D. C.; Hildebrand, S.; Jackson, S. O.; Echeverria, D.; Hassler, M. R.; Alterman, J. F.; DiFiglia, M.; Aronin, N.; Khvorova, A. Enhancing siRNA Efficacy in Vivo with Extended Nucleic Acid Backbones. *Nat. Biotechnol.* **2025**, *43* (6), 904–913. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02336-7>.
- (2) Ebenezer, O.; Oyebamiji, A. K.; Olanlokun, J. O.; Tuszynski, J. A.; Wong, G. K.-S.; Ebenezer, O.; Oyebamiji, A. K.; Olanlokun, J. O.; Tuszynski, J. A.; Wong, G. K.-S. Recent Update on siRNA Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (8). <https://doi.org/10.3390/ijms26083456>.
- (3) Isenmann, M.; Stoddart, M. J.; Schmelzeisen, R.; Gross, C.; Della Bella, E.; Rothweiler, R. M. Basic Principles of RNA Interference: Nucleic Acid Types and In Vitro Intracellular Delivery Methods. *Micromachines* **2023**, *14* (7), 1321. <https://doi.org/10.3390/mi14071321>.
- (4) Ratcliff, F.; Harrison, B. D.; Baulcombe, D. C. A Similarity between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science* **1997**, *276* (5318), 1558–1560.
- (5) Buccheri, V.; Pasulka, J.; Malik, R.; Loubalova, Z.; Taborska, E.; Horvat, F.; Roos Kulmann, M. I.; Jenickova, I.; Prochazka, J.; Sedlacek, R.; Svoboda, P. Functional Canonical RNAi in Mice Expressing a Truncated Dicer Isoform and Long dsRNA. *EMBO Rep.* **2024**, *25* (7), 2896–2913. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00148-z>.
- (6) *RNA Interference: Challenges and Therapeutic Opportunities*; Sioud, M., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1218. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1538-5>.
- (7) Dana, H.; Chalbatani, G. M.; Mahmoodzadeh, H.; Karimloo, R.; Rezaiean, O.; Moradzadeh, A.; Mehmandoost, N.; Moazzen, F.; Mazraeh, A.; Marmari, V.; Ebrahimi, M.; Rashno, M. M.; Abadi, S. J.; Gharagouzlo, E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **2017**, *13* (2), 48–57.
- (8) Wang, H.; Zhang, S.; Lv, J.; Cheng, Y. Design of Polymers for siRNA Delivery: Recent Progress and Challenges. *VIEW* **2021**, *2* (3), 20200026. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200026>.
- (9) Kalita, T.; Dezfouli, S. A.; Pandey, L. M.; Uludag, H. siRNA Functionalized Lipid Nanoparticles (LNPs) in Management of Diseases. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112520>.
- (10) *New breakthroughs in siRNA therapeutics expand the drug pipeline.* <https://www.cas.org/resources/cas-insights/sirna-therapeutics> (accessed 2026-02-17).
- (11) Ali Zaidi, S. S.; Fatima, F.; Ali Zaidi, S. A.; Zhou, D.; Deng, W.; Liu, S. Engineering siRNA Therapeutics: Challenges and Strategies. *J. Nanobiotechnology* **2023**, *21* (1), 381. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02147-z>.
- (12) Eckstein, F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24* (6), 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>.
- (13) Li, Q.; Dong, M.; Chen, P. Advances in Structural-Guided Modifications of siRNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2024**, *110*, 117825. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117825>.
- (14) Maguregui, A.; Abe, H. Developments in siRNA Modification and Ligand Conjugated Delivery To Enhance RNA Interference Ability. *ChemBioChem* **2020**, *21* (13), 1808–1815. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000009>.
- (15) 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.; Koteliensky, V.; Manoharan, M.; Stoffel, M. Mechanisms and Optimization of in Vivo Delivery of Lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (10), 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt1339>.
- (16) Matsuda, S.; Keiser, K.; Nair, J. K.; Charisse, K.; Manoharan, R. M.; Kretschmer, P.; Peng, C. G.; V. Kel'in, A.; Kandasamy, P.; Willoughby, J. L. S.; Liebow, A.; Querbes, W.; Yucius, K.; Nguyen, T.; Milstein, S.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M. siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent *N*-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing *In Vivo* in Hepatocytes. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (5), 1181–1187. <https://doi.org/10.1021/cb501028c>.

- (17) Yasuda, M.; Keel, S.; Balwani, M. RNA Interference Therapy in Acute Hepatic Porphyrrias. *Blood* **2023**, *142* (19), 1589–1599. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018662>.
- (18) Wu, K.; Li, Y.; Yi, Y.; Yu, Y.; Wang, Y.; Zhang, L.; Cao, Q.; Chen, K. The Detection, Function, and Therapeutic Potential of RNA 2'-O-Methylation. *Innov. Life* **2025**, *3* (1), 100112. <https://doi.org/10.59717/j.xinn-life.2024.100112>.
- (19) Yamamoto, K.; Fuchi, Y.; Ito, Y.; Hari, Y. Expansion of Phosphoramidite Chemistry in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Rapid 3'-Dephosphorylation and Strand Cleavage. *J. Org. Chem.* **2023**, *88* (5), 2726–2734. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c02195>.
- (20) Jeong, L. S.; Lee, J. H.; Jung, K.-E.; Moon, H. R.; Kim, K.; Lim, H. Synthesis and Hybridization Property of Sugar and Phosphate Linkage Modified Oligonucleotides.
- (21) Páv, O.; Košiová, I.; Barvík, I.; Pohl, R.; Buděšínský, M.; Rosenberg, I. Synthesis of Oligoribonucleotides with Phosphonate-Modified Linkages. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (17), 6120. <https://doi.org/10.1039/c1ob05488k>.
- (22) Henry, S. P.; Jagels, M. A.; Hugli, T. E.; Manalili, S.; Geary, R. S.; Giclas, P. C.; Levin, A. A. Mechanism of Alternative Complement Pathway Dysregulation by a Phosphorothioate Oligonucleotide in Monkey and Human Serum. *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24* (5), 326–335. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0491>.
- (23) Xiao, B.; Wang, S.; Pan, Y.; Zhi, W.; Gu, C.; Guo, T.; Zhai, J.; Li, C.; Chen, Y. Q.; Wang, R. Development, Opportunities, and Challenges of siRNA Nucleic Acid Drugs. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2025**, *36* (1), 102437. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102437>.