

# 抗体偶联核酸药物研究进展与挑战

孙一品, 刘煜

中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京

收稿日期: 2026年4月15日; 录用日期: 2026年5月14日; 发布日期: 2026年5月21日

## 摘要

核酸药物凭借其从基因层面干预疾病的独特优势, 已成为生物医药领域的研究热点。然而, 其在体内递送过程中面临稳定性差、靶向性不足及跨膜效率低等核心瓶颈, 限制了广泛应用。抗体偶联核酸药物(AOCs)通过将治疗性寡核苷酸与特异性抗体共价连接, 整合了抗体的高靶向性与核酸的基因调控功能, 为克服上述挑战提供了创新平台。文章系统综述了核酸药物的发展现状与瓶颈, 总结了AOCs的基本概念、设计原则、偶联化学与酶学策略, 并重点分析了其基于受体介导内吞的递送机制及内体逃逸这一关键限速环节。同时对AOCs临床应用所面临的挑战作一定的阐述。最后, 展望了AOCs在递送效率提升、结构均一性控制、组织特异性靶向及免疫原性优化等方面的未来发展方向, 为该领域的深入研究与临床转化提供参考。

## 关键词

抗体偶联核酸药物, 靶向递送, 内体逃逸, 偶联策略, 基因治疗

# Research Advances and Challenges in Antibody-Conjugated Nucleic Acid Drugs

Yipin Sun, Yu Liu

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: April 15, 2026; accepted: May 14, 2026; published: May 21, 2026

## Abstract

Nucleic acid drugs have become a research hotspot in the field of biomedicine because of their unique advantages of intervening in diseases at the genetic level. However, its delivery *in vivo* faces core bottlenecks such as poor stability, insufficient targeting, and low transmembrane efficiency, which limit its wide application. Antibody-linked nucleic acid drugs (AOCs) combine the high targeting of antibodies and the gene regulation function of nucleic acids by covalently linking therapeutic

**oligonucleotides to specific antibodies, and provide an innovative platform to overcome the above challenges. This article systematically reviews the development status and bottlenecks of nucleic acid drugs, summarizes the basic concept, design principles, coupling chemistry, and enzymatic strategies of AOCs, and focuses on the receptor-mediated endocytosis-based delivery mechanism and endosomal escape, the key rate-limiting link. At the same time, the challenges faced by the clinical application of AOCs are described. Finally, we prospected the future development direction of AOCs in terms of improving delivery efficiency, structural homogeneity control, tissue-specific targeting, and immunogenicity optimization, so as to provide a reference for in-depth research and clinical translation in this field.**

## Keywords

**Antibody-Conjugated Nucleic Acid Drug, Targeted Delivery, Endosomal Escape, Coupling Strategy, Gene Therapy**

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



## 1. 核酸药物的发展现状与瓶颈

核酸, 既是生命遗传和延续的物质基础, 也是生命活动运行和调控的核心。从生长繁殖到应激反应, 从物种延续到进化演变, 所有生命现象的源头, 最终都可以追溯到核酸及其所指导合成的蛋白质。这也是核酸药物能够从根源上干预疾病过程, 具有革命性潜力的原因。近几年来, 核酸药物逐渐走进大众视野。回顾它的发展, 自 20 世纪 90 年代初以来, 核酸药物这一领域经历了多次重大突破。1993 年, Ambros 和 Ruvkun 在秀丽隐杆线虫中首次发现 miRNA, 揭示了其在转录后基因调控中的重要作用[1][2]。到现在 2023 年, Karikó 和 Weissman 因在核苷碱基修饰方面的贡献获得诺贝尔生理学或医学奖, 其发现极大推动了 mRNA 疫苗和疗法的发展[3]。2024 年, 诺贝尔生理学或医学奖再次授予 Ambros 和 Ruvkun, 以表彰他们在 miRNA 的发现及其在转录后基因调控中作用研究方面的开创性贡献[4]。越来越多的科研项目聚焦核酸药物这一领域, 极大地推动了其发展。核酸药物包括反义寡核苷酸(Antisense Oligo Nucleotide, ASO)、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)、小激活 RNA (small activating RNA, saRNA)、向导 RNA (small-guide RNA, sgRNA)、适配体(Aptamer)、抗体核酸偶联药物 (Antibody-Oligonucleotide Conjugates, AOCs) 以及多肽核酸偶联药物 (Peptide-Oligonucleotide Conjugates, POCs) 等[5]。

1998 年, 第一个核酸药物 Vitravene 被美国 FDA 批准上市后, 多个核酸药物开始进入临床实验。截止 2025 年 9 月, 全球已上市 22 款核酸药物。传统药物大多数针对蛋白靶点, 但仅覆盖致病靶点的 15% [6], 治疗效果参差不齐。而核酸药物根据其信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 理论上可以精准靶向任何靶点基因序列, 特异性高, 很大程度提高了治疗的成功性、准确性。然而, 核酸药物需要进入到胞内才能发挥作用。其本身固有的高负电荷密度及入胞后核酸酶引起的不稳定性, 要求核酸药物的体内递送需依赖载体介导[7]。因此, 载体的开发需要基于对体内生理屏障的深入研究, 包括循环中的降解清除与蛋白吸附、血脑屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)、细胞摄取障碍、突破内吞体或者溶酶体屏障, 以及药物到达指定部位的释放机制等。上市药物所使用的递送载体主要为纳米递送载体(NA)、脂质纳米颗粒(Lipid Nanoparticles, LNPs)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)等。通过调整载体的物理和化学特性, 引入官能团进行表

面修饰, 可增强载体的稳定性、提高其对免疫监控的逃逸能力、优化器官靶向性和细胞定向性, 以及提升对微环境的敏感性等。虽然传统递送载体在理论上具有高靶向性和广泛靶点覆盖的优势, 但其在体内稳定性、细胞递送效率、靶向性和安全性[8]等方面的局限, 仍是制约其广泛临床应用的根本性问题。例如, 大多数核酸药物的递送系统(如 LNP 和 GalNAc)虽然在肝脏靶向上表现出色, 但对肝以外组织(如肿瘤、脑、心脏)的特异性递送仍显不足[9]。LNP 体系是目前最早实现临床成功的核酸递送平台之一, 其代表性应用包括 siRNA 药物及 mRNA 疫苗。LNP 通过包裹核酸分子并依赖载脂蛋白 E (ApoE)介导与肝细胞表面低密度脂蛋白受体(LDLR)结合, 从而实现高效的肝脏富集。但在肝外组织中的递送效率仍然有限, 尤其是在骨骼肌、中枢神经系统等屏障较强或受体表达有限的组织中, 其转染效率显著下降。相比之下, GalNAc 偶联体系通过与肝细胞表面高表达的去唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein Receptor, ASGPR)特异性结合, 实现了高度选择性的肝靶向递送, 是当前 siRNA 药物中最成熟、最成功的递送策略之一。但与此同时, 因其靶向机制高度依赖 ASGPR 的表达分布, 从而几乎完全局限于肝脏组织。尽管有研究尝试开发类似 GalNAc 的其他糖配体以拓展靶向范围, 但目前尚未形成具有临床可行性的肝外递送体系。这些核心瓶颈为核酸药物递送系统创新提供了明确的方向和动力。

**Table 1.** Representative AOC projects that have entered the clinical stage

**表 1.** 进入临床阶段的代表性 AOC 项目

药物名称	靶点	技术平台	适应症	研发阶段
Del-desiran (AOC 1001)	DMPK mRNA	TfR1 单抗 + siRNA	1 型强直性肌营养不良症(DM1)	临床 3 期(全球首个进入 3 期的 AOC)
Del-zota (AOC 1044)	DMD 外显子 44	TfR1 单抗 + PMO	杜氏肌营养不良症(DMD44)	临床 2 期完成, 计划 2025 年底提交上市申请
Del-brax (AOC 1020)	DUX4 mRNA	TfR1 单抗 + siRNA	面肩胛型肌营养不良症(FSHD)	临床 3 期(进行中)
DYNE-101	DMPK mRNA	FORCE™平台(TfR1 Fab + ASO)	1 型强直性肌营养不良症(DM1)	临床 1/2 期(计划 2026 年底提交上市申请)
DYNE-251	DMD 外显子 51	FORCE™平台(TfR1 Fab + PMO)	杜氏肌营养不良症(DMD51)	临床 1/2 期
TAC-001	CD22 (靶向 B 细胞)	TRAAC (TLR9 激动剂抗体偶联物)	晚期实体瘤	临床 1/2 期
Tividenofusp alfa (DNL310)	IDS (艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶)	TV 平台(工程化 TfR 抗体 + 酶)	亨特综合征(MPS II)	临床 3 期
OTV:MAPT	MAPT (编码 tau 蛋白)	OTV 平台(工程化载体 + ASO)	阿尔茨海默病	临床前研究(IND 申请阶段)
OTV:SNCA	SNCA (编码 $\alpha$ -synuclein)	OTV 平台(工程化载体 + ASO)	帕金森病	临床前研究(IND 申请阶段)

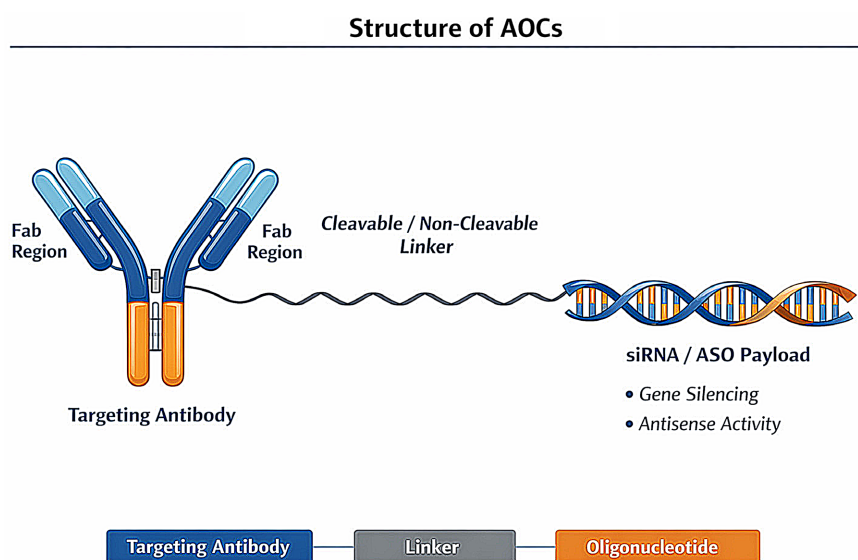
鉴于传统核酸药物在体内递送中面临的稳定性、靶向性和有效跨膜进入等一系列挑战, 研究人员将目光转向抗体, 抗体作为递送载体为核酸药物提供了一种高效、特异且可控的递送平台。抗体偶联寡核苷酸(Antibody Oligonucleotide Conjugates, AOCs)选择性识别细胞表面的特异性抗原或受体, 使其携带的核酸载荷优先积聚于靶组织[10]。抗体递送核酸的另一个关键机制是受体介导的内吞作用: 抗体部分识别靶细胞表面高表达受体 TfR1、HER2、EGFR、CD71 等, 并触发内吞过程, 使核酸载荷进入细胞内部[11]。这种机制不仅克服了核酸负电荷和膜通透性的天然障碍, 而且实现了受体依赖的高效细胞摄取。单独核

酸药物常因分子量小、易被核酸酶降解及肾脏快速清除而具有短循环半衰期。抗体本身具有 FcRn-介导的回收机制[12],可延长循环时间并提高生物利用度。抗体-寡核苷酸共轭物因继承了抗体的这些药代优势,在体内表现出更长的暴露时间和更稳定的循环动力学,有利于提高靶组织累积与疗效。目前进入临床阶段的代表 AOC 如表 1 所示。

## 2. 抗体偶联核酸药物(AOCs)的发展

### 2.1. 抗体偶联核酸药物的概念

AOCs 是一类由抗体、连接子(Linker)和治疗性寡核苷酸载荷组成的嵌合分子,通过共价或可控化学方式将核酸药物与抗体直接偶联,以兼具抗体的高靶向性与核酸的基因调控功能[13]。AOCs 的基本构成可以看作是对传统抗体-药物偶联物(ADC)的概念性扩展(见图 1):不同于 ADC 载体的是毒性化合物(小分子药物),其可以通过多种化学偶联策略实现核酸与抗体的结合,包括位点特异性偶联、随机化学偶联以及自组装方法等,从而允许优化寡核苷酸-抗体比率(OAR)和连接子特性,以提升 PK/PD 效果[14]。AOCs 的发展经历了几个重要阶段,从最早的抗体-siRNA 偶联研究通过 THIOMAB™等平台将 siRNA 连接到 mAb 上,尽管初期在体内活性有限,但证明了抗体可携带核酸进入细胞的可行性[15]。随着链接化学和位点特异性策略的进步,不同偶联位点、连接子性质以及 OAR 对药代动力学与基因沉默效率的影响,推动了 AOC 技术的可控性和功能性[14]。近年来,基于 TfR1 等受体介导的 AOCs 展示了在骨骼肌和心肌组织中显著提高核酸富集和基因沉默的能力,这表明 AOC 已开始解决传统核酸药物难以实现体外组织递送的瓶颈[16]。随着 AOC 设计、制造与质量控制体系的建立,这一技术已从概念验证逐步走向临床和产业化。未来的发展方向包括更高精度的偶联技术、增强内体逃逸机制、智能靶向载体设计等。



**Figure 1.** Schematic illustration of the basic structure of AOC

**图 1.** AOC 基本结构示意图

### 2.2. 抗体偶联核酸药物的设计原则

#### 2.2.1. 抗体选择

在抗体偶联核酸药物的设计中,抗体本身不仅是靶向递送的核心导航部件,还决定了药物的体内动力学、细胞摄取路径及治疗效果。选择合适的抗体类型和靶标是构建高效 AOC 的基础,其关键考量包括

受体表达谱、内吞能力、抗原密度、免疫原性以及抗体构型对核酸载荷的容纳性等。

AOCs 的抗体部分必须针对具备高表达且可介导内吞的细胞表面受体。内吞是 AOC 递送核酸进入细胞的关键第一步, 因此靶标受体不仅要高度特异, 还需触发有效的受体介导内吞。常见靶标包括: 转铁蛋白受体 1 (TfR1): 在肌肉、脑和心脏中高表达, 可介导快速内吞, 已被成功用于将 siRNA 和 ASO 运送至骨骼肌和心肌组织, 显示比无靶向载体高出数倍的组织累积效果[10]。Avidity Biosciences 公司利用 TfR1 的单克隆抗体和靶向 DMPK mRNA 的 siRNA 偶联, 降低 DM1 患者成纤维细胞中异常 DMPK 的 mRNA, 可缓解 DM1 症状[17]。肝细胞表面受体(ASGR): 在肝脏细胞上富集, 常用于肝脏特异性递送。其受体介导内吞效率高, 是 GalNAc 技术成功的基础之一[18]。

抗体的结构和类型, 也是在设计 AOCs 药物中必不可少的一环。全长单克隆抗体(Full-lengthIgG)具备成熟的开发体系、较长的血浆半衰期及 FcRn-介导的循环回收机制, 进而提高 AOC 的体内稳定性和循环暴露。IgG 还可以通过多种化学和酶学位点特异性偶联策略(如 THIOMAB、MTGase 方法)将核酸载荷定位至特定区域, 而不会显著干扰抗原结合活性[15]。Fab 或单链抗体片段(scFv)由于分子量小、组织穿透性强, 在某些深部组织或细胞类型中显示出更快的渗透能力。片段抗体还可减小偶联物尺寸, 从而提高肿瘤间质穿透效能。但需要权衡的是减少的 Fc 部分可能因为其较短的循环时间限制核酸药物的体内作用[19]。Dyne Therapeutics 公司将抗体与小核酸(siRNA、ASO 等)连接构建治疗分子, 将 PMO 与抗原结合片段(Fab)结合, 靶向 TfR1, 由于不是全长抗体而是较小的抗原结合片段, 耐受性更有利。Dyne-101 通过敲低核内 DMPK mRNA 和纠正剪接, 逆转肌强直性, 已用于 DM1 的 I/II 期临床试验[20]。新型抗体形式, 纳米抗体(Nanobody/VHH)结构极小、亲和力高且易于工程化, 近年来也被纳入 AOC 设计的候选。其免疫原性低、可快速组织扩散的特点使其在一些特定组织靶向递送中具备优势, 尤其是在需要穿透组织屏障的场景中。双特异性抗体(Bispecific Antibody)可同时结合两个不同靶标, 比如一侧靶向组织特异性受体, 另一侧促进内吞或跨屏障运输, 这种设计在中枢神经系统递送中具有潜力, 但在 AOC 中仍处于探索阶段[21]。

另外, 抗体亲和力也是影响抗体影响 AOC 功效的重要因素。抗体的亲和力不仅影响 AOC 在体内靶向结合效率, 还关联内吞效率。高亲和力抗体往往在靶标细胞表面结合更牢固, 并触发更有效的受体内吞。然而, 过高亲和力可能导致抗体-受体复合物停留在细胞表面或内体, 这反而影响实质性核酸释放。因此, 不同抗体偶联位点和亲和力组合可显著影响 siRNA 的细胞内递送效率及 RNAi 活性[15]。因此, 在抗体筛选中通常需要平衡结合能力与内吞后处理, 以确保既能高效结合, 又能促进有效的内吞与核酸功能释放, 而非单纯追求最高亲和力。

最后, 临床可行的 AOC 抗体往往经人源化或全人源设计, 以降低免疫原性和异体反应风险, 同时维持对靶标的高亲和力。此外, 通过工程手段引入位点可控的偶联位点(如 THIOMAB Cys)或酶学标签[22], 可实现均一的偶联构型, 从而提高质量可控性和生物活性一致性。

### 2.2.2. 核酸药物类型与结构优化

ASO 由 12~25 个碱基的 DNA 或 RNA 分子组成[23], 通过碱基互补与靶 mRNA 结合后, 可介导 RNaseH1 依赖的裂解或者通过阻断翻译/剪接来调控基因表达。因此可被设计成特异性靶向致病基因和蛋白质。这种方法能够最大限度地减少脱靶效应, 并最大限度地提高治疗效果。ASO 可以根据特定基因突变进行修饰, 使其成为基于每位患者基因谱治疗遗传性疾病的理想药物[24]。目前, 主流的 ASO 化学结构修饰目的在于提高其结合稳定性、降低其毒性并减少非特异性结合。主要有三种方法: 核苷酸间连接修饰、糖修饰和核碱基修饰[25]。

RNAi 是一种内在的转录后基因调控机制, 自其在秀丽隐杆线虫中被发现以来, 已被用于治疗开发[26]。siRNA 是长度约 20~25 个核苷酸的双链 RNA, 通过 RNA 干扰(RNAi)机制与 RNA 诱导沉默复合体

(RISC)结合, 引导序列特异性 mRNA 裂解, 从而实现靶基因沉默[27]。目前, 靶向肝脏的 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)偶联 siRNA 已取得临床成功, 多种药物获批上市。未修饰的 siRNA 代谢稳定性差, 在体内极易降解(1 分钟内降解超过 50%) [28]。双链 siRNA 还会触发先天免疫反应[29]并导致脱靶效应。这些问题通过引入某些 2'-核糖和末端骨架修饰得到了很大程度的解决, 包括 2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-氟(2'-F)和硫代磷酸酯(PS) [30]。现在几乎所有先进的 siRNA 设计中都使用了这三种修饰。

SSO 通过修饰 pre-mRNA 的剪接模式来产生新的剪接事件, 用于疾病如杜氏肌营养不良症的外显子跳跃疗法。适配体则是能折叠成三维结构并与靶标蛋白高亲和结合的分子, 可作为直接的抑制剂或递送配体[8]。

### 3. 抗体 - 核酸偶联化学与酶学策略

随机化学偶联是抗体偶联核酸药物(AOCs)中最早发展且应用最广泛的偶联策略之一。该方法主要依赖抗体天然存在的反应性氨基酸侧链(如赖氨酸(Lys)和半胱氨酸(Cys))与活性连接子发生共价反应, 从而实现核酸分子与抗体的连接。由于其操作简便、无需复杂蛋白工程改造, 随机偶联在早期 AOC 和抗体-siRNA 体系中被广泛采用[31]。

#### 3.1. 基于赖氨酸(Lys)的随机偶联

赖氨酸侧链上的  $\epsilon$ -氨基在生理条件下具有较高的反应活性, 是随机偶联中最常用的反应位点之一。典型方法为: NHS 酯(N-hydroxysuccinimide ester)化学偶联, NHS 酯可与抗体表面的游离氨基反应形成稳定的酰胺键, 从而实现核酸或连接子的引入。该方法的优势在于: 反应条件温和(接近中性 pH), 不需要对抗体进行预修饰, 工艺成熟, 适用于规模化制备。然而, 由于 IgG 分子表面通常含有 80~100 个以上潜在赖氨酸位点, 偶联发生在多个不同位置, 导致产物具有明显的结构异质性(Heterogeneity)和 DAR/OAR 分布不均一问题[32]。

#### 3.2. 基于半胱氨酸(Cys)的随机偶联

另一类常用策略是基于抗体中半胱氨酸残基的巯基(-SH)进行偶联, 主要缺点是结合位点缺乏特异性。为了改进这一方法, 后续利用工程化半胱氨酸或引入非天然氨基酸进行偶联的方法可以提高抗体药物偶联物(ADC)的均一性[33]。Junutula 等[34]开发了一种基于半胱氨酸的位点特异性偶联方法, 称为“THIOMABS” (TDCs)。该方法最初是为获得抗体药物偶联物(ADC)而开发的, 但也成功应用于抗逆转录病毒药物(ARC)。有研究称, 与传统偶联方法相比, 该方法具有更高的治疗指数。这种方法能够生成近乎均一的偶联物, 其每个抗体分子所含的药物数量少于传统 ADC, 且不存在大量未偶联抗体。然而, 基于工程化半胱氨酸的偶联需要氧化还原步骤, 这可能导致天然半胱氨酸残留反应活性[35]。

#### 3.3. 转谷氨酰胺酶(MTG)催化偶联

酶学偶联方法利用酶的底物特异性, 在抗体特定位点进行精准修饰, 是当前发展迅速的一类策略。目前主流倾向于采用酶促微生物转谷氨酰胺酶(MTGase), 其是一种廉价高效的细菌酶, 参与细胞壁的合成, 通过催化赖氨酸氨基和谷氨酰胺残基酰胺基之间形成异肽键来交联蛋白质[36]。该方法已被用于生成 DAR-2 特异性抗体药物偶联物(ADC) [37], 需要在单克隆抗体(mAb)编码序列中插入谷氨酰胺连接基团, 通过在抗体 Fc 区引入特定识别序列, 如 LLQG 标签, 可实现高度特异性偶联。

#### 3.4. 糖偶联

糖基工程(Glycan Engineering)是一类利用抗体 Fc 区天然糖基化结构进行位点特异性修饰的偶联策略,

在抗体偶联核酸药物中具有重要应用潜力。该方法主要基于 IgG 抗体 Fc 区 Asn297 位点的 N-连接型糖链 (N-Linked Glycan), 通过酶学或化学方法对糖链进行定向改造, 从而引入可用于后续偶联反应的功能基团 [38]。对 Fc 糖链进行修饰通常不会显著改变抗体的抗原结合能力, 但可能影响 Fc 介导的效应功能(如 ADCC、CDC), 需根据具体应用进行评估[19]。糖基偶联实现了高度可控的位点特异性修饰, 在 AOC 构建中展现出显著优势。其高均一性、不影响抗原结合及良好的生物相容性使其成为当前最具潜力的偶联策略之一。

### 3.5. 点击化学(Click Chemistry)在 AOC 中的应用

点击化学(Click Chemistry)是一类具有高选择性、高反应效率及良好生物正交性(Bioorthogonality)的化学反应体系, 近年来在抗体偶联核酸药物构建中得到了广泛应用。其通常与位点特异性修饰策略(如糖基工程、非天然氨基酸引入、工程化半胱氨酸)联合使用, 实现抗体与核酸分子的精准偶联, 从而有效提高 AOC 的结构均一性与功能稳定性, 见图 2 [33]。应用于 AOC 构建的点击化学主要包括铜催化叠氮-炔环加成反应(CuAAC)、应变促进叠氮-炔环加成反应(SPAAC)以及反电子需求 Diels-Alder 反应(IEDDA)。点击化学在 AOC 中的应用不仅提高了偶联效率, 更重要的是显著改善了药物的整体性能。首先, 其高度的生物正交性确保反应仅在预设位点发生, 从而避免对抗体结构及核酸功能的干扰。其次, 点击反应通常在水相、接近生理条件下进行, 有利于维持蛋白质与核酸的稳定性其中。尽管点击化学在 AOC 领域展现出显著优势, 但仍存在一定局限性, CuAAC 反应由于铜离子可能引起蛋白质氧化或核酸降解, 其在生物体系中的应用受到一定限制[39]。相比之下, SPAAC 和 IEDDA 反应虽然避免了金属催化剂带来的毒性问题, 但通常需要引入体积较大的反应基团(如 DBCO 或 TCO)。这些大体积结构不仅可能引入显著的空间位阻, 从而影响偶联反应动力学, 还可能对生物大分子的构象及其体内行为(如分布和靶向性)产生潜在影响[40]。

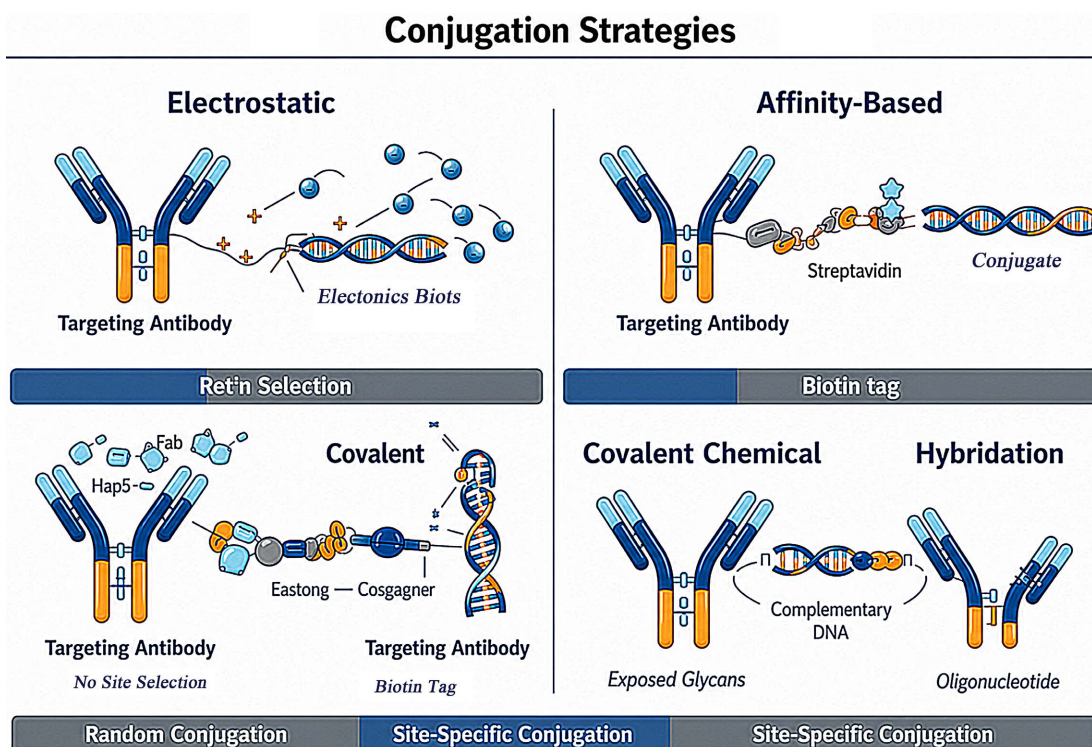


Figure 2. Comparison of AOC site-specific coupling strategies

图 2. AOC 不同位点特异性偶联策略比较图

## 4. 抗体偶联核酸药物的递送机制

### 4.1. 靶向结合与受体介导内吞

抗体偶联核酸药物的递送效率在很大程度上依赖于其对靶细胞的特异性识别及后续的细胞内摄取过程。其中, 抗体介导的靶向结合与受体介导内吞(Receptor-Mediated Endocytosis)被认为是实现 AOC 细胞内递送的核心机制。通过抗体对特定细胞表面抗原的高亲和力识别, AOCs 能够实现对目标细胞的精准定位, 并借助受体内吞途径进入细胞, 从而提高核酸药物的局部浓度并降低非特异性暴露[41]。

受体介导内吞通常通过多种经典内吞途径实现, 其中以网格蛋白介导的内吞(Clatrin-Mediated Endocytosis)最为常见。在该过程中, 抗体与细胞表面受体结合后形成复合物, 随后被包裹进入内吞小泡, 并逐步转运至早期内体(Early Endosome)及晚期内体(Late Endosome) [42]。此外, 某些受体还可通过洞蛋白介导内吞(Caveolae-Mediated Endocytosis)或其他非经典途径进入细胞, 这些不同的内吞路径可能影响 AOC 的胞内转运轨迹及最终命运[43]。

进入内体后, AOCs 面临一个关键的生物学屏障, 即内体 - 溶酶体途径的降解风险。多数内吞进入的分子最终会被转运至溶酶体并发生降解, 从而限制核酸药物释放至细胞质或细胞核的效率。因此, 提高内体逃逸(Endosomal Escape)能力被认为是提升 AOC 治疗效果的关键因素之一[44]。同时, 这一低效率过程也构成了核酸药物递送的主要瓶颈。

### 4.2. 内体逃逸机制(Endosomal Escape)

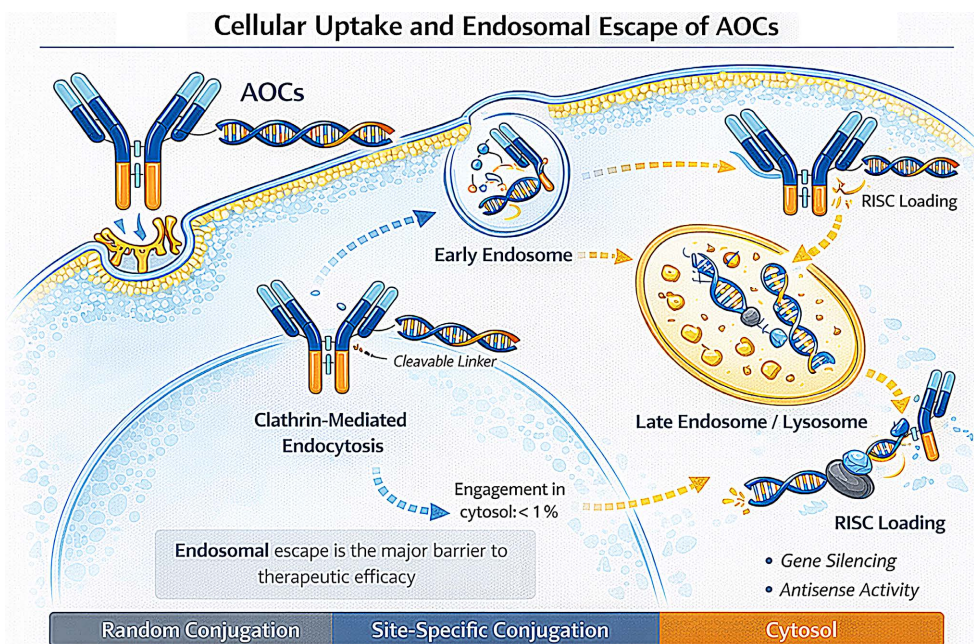
大量研究表明, 经由内吞途径进入细胞的外源性大分子绝大多数最终被转运至溶酶体并降解, 仅有极少比例能够成功逃逸至细胞质发挥作用, 这一过程被认为是限制核酸药物疗效的核心障碍之一[45]。本质在于核酸分子或其载体突破内体膜结构, 实现从内体腔向细胞质的跨膜转运。内吞形成的早期内体在酸化过程中逐渐成熟为晚期内体及溶酶体, 其内部 pH 逐步降低, 同时伴随多种水解酶的富集, 这一环境对核酸分子具有显著的降解风险[42]。因此, AOC 若无法在内体成熟过程中及时实现逃逸, 将难以有效发挥其基因沉默或调控功能。AOC 内吞作用进入细胞及内体逃逸机制如图 3 所示。

目前, 关于内体逃逸的机制尚未完全阐明, 但已有多种假说用于解释这一过程。其中, “质子海绵效应”(Proton Sponge Effect)是较早提出的经典模型之一。该机制认为, 具有高缓冲能力的分子(如富含胺基的聚合物或某些阳离子结构)在内体酸化过程中可持续吸收质子, 导致氯离子及水分子内流, 从而引起内体膨胀并最终破裂, 实现内容物释放[46]。除质子海绵效应外, 膜扰动(Membrane Destabilization)被认为是更为重要的内体逃逸机制之一。某些分子结构(如疏水基团或两亲性结构)能够与内体膜相互作用, 改变脂质双层的稳定性, 从而诱导膜通透性增加或局部破裂。这类机制在脂质纳米颗粒(LNP)及某些寡核苷酸修饰体系中已有较多报道, 并被认为是实现高效胞质递送的重要基础[47]。

在 AOC 体系中, 由于抗体本身缺乏显著的膜破坏能力, 其内体逃逸效率通常较低。因此, 研究者常通过引入功能性连接子或辅助结构来增强逃逸能力。例如, 可设计 pH 响应性连接子, 在内体酸性环境中发生构象变化或断裂, 从而促进核酸释放; 或引入具有膜活性的肽段(如 Cell-Penetrating Peptides, CPPs)以增强膜扰动能力[48]。

## 5. 临床开发与产业化挑战

抗体偶联核酸药物其临床转化与产业化进程目前仍处于早期阶段, 面临多重系统性挑战。从当前发展态势来看, AOC 领域尚未有产品获批上市, 绝大多数候选药物仍处于临床前或 I/II 期临床研究阶段, 研究重点主要集中于肿瘤、神经肌肉疾病及罕见遗传病等领域[49]。



**Figure 3.** Mechanistic diagram of AOC endocytosis into cells and endosomal escape  
**图 3.** AOC 内吞作用进入细胞及内体逃逸的机制图

在药代动力学(Pharmacokinetics, PK)与药效学(Pharmacodynamics, PD)方面, AOCs 表现出区别于传统抗体或核酸药物的复杂特征。由于其由抗体与寡核苷酸两种功能模块组成, AOCs 在体内的分布、代谢及清除过程呈现出明显的“双组分行为”。抗体部分通常决定其血浆半衰期与组织分布, 而寡核苷酸部分则主导细胞摄取、胞内转运及最终药效发挥[50]。然而, 在体内环境中, 偶联结构可能发生部分解离或代谢, 产生游离抗体或寡核苷酸片段, 从而进一步增加 PK 行为的复杂性。因此, AOC 的药代评价通常需要同时监测完整偶联物、游离核酸及代谢产物, 这对分析方法提出了更高要求。在药效方面, AOC 的活性不仅取决于系统暴露水平, 还依赖于一系列细胞内过程, 包括受体介导内吞、内体逃逸及核酸释放等步骤, 使得其 PK/PD 关系呈现出显著的非线性与时间滞后特征, 增加了剂量优化与疗效预测的难度[45]。

毒理学评价同样构成 AOC 临床开发中的关键挑战。AOCs 的毒性来源具有多重性, 既包括抗体介导的靶点相关毒性(On-Target/Off-Target Effects), 也涉及寡核苷酸引发的免疫激活反应以及偶联结构本身可能带来的新型毒性风险[51]。其中, 寡核苷酸可通过激活 Toll 样受体(Toll-Like Receptors, TLRs)等先天免疫通路诱导炎症反应, 而抗体部分则可能因靶点表达分布差异导致组织特异性毒性。此外, AOCs 在不同物种中的分布及靶点表达差异较大, 使得动物模型对人体毒性的预测能力有限, 增加了临床安全性评估的不确定性[49]。因此, 未来亟需建立更加合理的非临床评价体系, 并结合转化医学策略提升毒理学预测的准确性。

在化学、生产与质量控制方面, AOCs 的复杂性远高于传统抗体药物或抗体药物偶联物, 构成其产业化的主要瓶颈之一。AOCs 通常由高分子量抗体、带有强负电荷的寡核苷酸以及多样化连接子构成, 这种结构复杂性导致其产品呈现高度异质性, 并显著增加了分析表征的难度。例如, 传统用于 ADC 分析的疏水相互作用色谱(HIC)在 AOC 体系中往往不再适用, 需要结合离子交换色谱、毛细管电泳及高分辨质谱等多种技术手段进行综合分析。此外, AOC 还需要建立一系列特有的关键质量属性, 包括寡核苷酸负载数(Oligonucleotide-to-Antibody Ratio, OAR)、核酸完整性、连接子稳定性以及抗原结合活性等, 这些参数的精确测定对于产品一致性与临床安全性至关重要。

## 6. 抗体偶联核酸药物的展望

尽管抗体偶联核酸药物在靶向递送和精准治疗方面展现出显著潜力,但其整体发展仍处于早期阶段,尚面临多重关键科学与工程挑战。未来研究需在递送效率、结构优化、体内行为调控及临床转化等多个层面实现系统性突破,以推动该领域从概念验证走向广泛应用。

首先,递送效率仍然是限制 AOC 治疗效果的核心瓶颈,其中以体内逃逸效率低下尤为突出。已有研究表明,大多数内吞进入细胞的核酸分子难以逃逸体内并进入细胞质,这直接限制了 RNA 干扰或反义寡核苷酸的发挥。未来的发展方向之一在于设计具有“响应”特性的连接子或递送模块,例如 pH 响应、酶切或还原敏感结构,以在体内环境中触发核酸释放并促进膜穿透,也有望显著提高胞质递送效率。

其次, AOC 的结构均一性与可控性仍需进一步优化。传统随机偶联方法容易导致产物异质性,从而影响药代动力学行为及疗效稳定性。近年来,位点特异性偶联技术(如糖基工程、非天然氨基酸引入及酶促偶联)已显著提高偶联精度,但在大规模生产和工艺稳定性方面仍存在挑战[52]。未来需要发展更加高效、可放大且符合工业化标准的偶联策略,以实现核酸负载数(Oligonucleotide-to-Antibody Ratio, OAR)及连接位点的精确控制。

最后,靶点选择与组织特异性递送策略仍有较大拓展空间。目前, AOC 研究多集中于肝脏或肿瘤等易于递送的组织,而对于中枢神经系统(CNS)、肌肉及免疫细胞等难以靶向的组织,仍缺乏高效解决方案。近年来,以转铁蛋白受体(TfR)为代表的跨血脑屏障递送策略已取得一定进展,但其效率与安全性仍需进一步优化。未来,通过筛选新型内吞受体、开发双特异性抗体或工程化抗体平台,有望实现更加精准的组织与细胞类型靶向递送。

此外, AOC 的体内行为与免疫原性问题也亟需深入研究。抗体与核酸的偶联可能改变分子的电荷分布、构象及稳定性,从而影响其体内分布、清除路径及免疫识别。特别是核酸部分可能激活先天免疫系统(如 Toll 样受体, TLRs),导致炎症反应或毒性问题。因此,未来需要通过化学修饰(如 2'-O-甲基、磷硫修饰等)及结构优化降低免疫激活风险,同时结合系统药代动力学(PK)与药效学(PD)研究,建立更加完善的体内行为预测模型[50]。

从技术整合角度来看, AOC 的发展将越来越依赖于多学科交叉融合。例如,将 AOC 与脂质纳米颗粒(LNP)、外泌体或聚合物递送系统相结合,有望兼顾抗体靶向性与纳米载体高效递送能力,这些发展都将为抗体偶联核酸药物提供新的发展机遇。

## 参考文献

- [1] Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell*, **75**, 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- [2] Mello, C. (2007) Return to the RNAi World: Rethinking Gene Expression and Evolution. *Cell Death & Differentiation*, **14**, 2013-2020. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402252>
- [3] Pederson, T. (2024) Tributaries of the 2023 Nobel Prize in Physiology or Medicine, and Lessons Learned. *RNA*, **30**, 101-104. <https://doi.org/10.1261/rna.079874.123>
- [4] Kim, Y. and Han, J. (2024) Nobel-Winning MicroRNA, the Micromaestro of Gene Silencing. *Molecules and Cells*, **47**, Article ID: 100123. <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100123>
- [5] Kole, R., Krainer, A.R. and Altman, S. (2012) RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery*, **11**, 125-140. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>
- [6] Watts, J.K., Brown, R.H. and Khvorova, A. (2019) Nucleic Acid Therapeutics for Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, **16**, 245-247. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00736-1>
- [7] Ji, W., Li, Y., Peng, H., Zhao, R. and Zhang, X. (2022) Nature-Inspired Dynamic Gene-Loaded Nanoassemblies for the Treatment of Brain Diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **180**, Article ID: 114029. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114029>

- [8] Thakur, S., Sinhari, A., Jain, P. and Jadhav, H.R. (2022) A Perspective on Oligonucleotide Therapy: Approaches to Patient Customization. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article 1006304. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1006304>
- [9] Hammond, S.M., Aartsma-Rus, A., Alves, S., Borgos, S.E., Buijsen, R.A.M., Collin, R.W.J., *et al.* (2021) Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics: Challenges and Opportunities. *EMBO Molecular Medicine*, **13**, e13243. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013243>
- [10] Malecova, B., Burke, R.S., Cochran, M., Hood, M.D., Johns, R., Kovach, P.R., *et al.* (2023) Targeted Tissue Delivery of RNA Therapeutics Using Antibody-Oligonucleotide Conjugates (AOCs). *Nucleic Acids Research*, **51**, 5901-5910. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad415>
- [11] Ming, X. (2011) Cellular Delivery of siRNA and Antisense Oligonucleotides via Receptor-Mediated Endocytosis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **8**, 435-449. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.561313>
- [12] Roopenian, D.C. and Akilesh, S. (2007) FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age. *Nature Reviews Immunology*, **7**, 715-725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>
- [13] Li, M., An, H., Zhang, J., Li, W., Yu, C. and Wang, L. (2025) Advances in the Pharmaceutical Development of Antibody-Oligonucleotide Conjugates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **215**, Article ID: 107292. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107292>
- [14] Cochran, M., Arias, D., Burke, R., Chu, D., Erdogan, G., Hood, M., *et al.* (2024) Structure-Activity Relationship of Antibody-Oligonucleotide Conjugates: Evaluating Bioconjugation Strategies for Antibody-siRNA Conjugates for Drug Development. *Journal of Medicinal Chemistry*, **67**, 14852-14867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00802>
- [15] Cuellar, T.L., Barnes, D., Nelson, C., Tanguay, J., Yu, S., Wen, X., *et al.* (2015) Systematic Evaluation of Antibody-Mediated siRNA Delivery Using an Industrial Platform of THIOMAB-siRNA Conjugates. *Nucleic Acids Research*, **43**, 1189-1203. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1362>
- [16] Sugo, T., Terada, M., Oikawa, T., Miyata, K., Nishimura, S., Kenjo, E., *et al.* (2016) Development of Antibody-siRNA Conjugate Targeted to Cardiac and Skeletal Muscles. *Journal of Controlled Release*, **237**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.036>
- [17] Thornton, C.A., Moxley, R.T., Eichinger, K., Heatwole, C., Mignon, L., Arnold, W.D., *et al.* (2023) Antisense Oligonucleotide Targeting DMPK in Patients with Myotonic Dystrophy Type 1: A Multicentre, Randomised, Dose-Escalation, Placebo-Controlled, Phase 1/2a Trial. *The Lancet Neurology*, **22**, 218-228. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(23\)00001-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(23)00001-7)
- [18] Roberts, T.C., Langer, R. and Wood, M.J.A. (2020) Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **19**, 673-694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- [19] Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. and Corvaia, N. (2017) Strategies and Challenges for the Next Generation of Antibody-Drug Conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery*, **16**, 315-337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
- [20] Hong, Y., Nam, S. and Moon, A. (2023) Antibody-Drug Conjugates and Bispecific Antibodies Targeting Cancers: Applications of Click Chemistry. *Archives of Pharmacal Research*, **46**, 131-148. <https://doi.org/10.1007/s12272-023-01433-6>
- [21] Labrijn, A.F., Janmaat, M.L., Reichert, J.M. and Parren, P.W.H.I. (2019) Bispecific Antibodies: A Mechanistic Review of the Pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 585-608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>
- [22] Huggins, I.J., Medina, C.A., Springer, A.D., van den Berg, A., Jadhav, S., Cui, X., *et al.* (2019) Site Selective Antibody-Oligonucleotide Conjugation via Microbial Transglutaminase. *Molecules*, **24**, Article 3287. <https://doi.org/10.3390/molecules24183287>
- [23] Quemener, A.M., Bachelot, L., Forestier, A., Donnou-Fournet, E., Gilot, D. and Galibert, M. (2020) The Powerful World of Antisense Oligonucleotides: From Bench to Bedside. *WIREs RNA*, **11**, e1594. <https://doi.org/10.1002/wrna.1594>
- [24] Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., *et al.* (2020) Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *Journal of Clinical Medicine*, **9**, Article 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm9062004>
- [25] Deleavey, G.F. and Damha, M.J. (2012) Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing. *Chemistry & Biology*, **19**, 937-954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
- [26] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, **391**, 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- [27] Yin, W. and Rogge, M. (2019) Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy. *Clinical and Translational Science*, **12**, 98-112. <https://doi.org/10.1111/cts.12624>
- [28] Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A. and Sullenger, B.A. (2004) *In Vivo* Activity of Nuclease-Resistant siRNAs. *RNA*, **10**, 766-771. <https://doi.org/10.1261/rna.5239604>
- [29] Gantier, M.P. and Williams, B.R.G. (2007) The Response of Mammalian Cells to Double-Stranded RNA. *Cytokine &*

- Growth Factor Reviews*, **18**, 363-371. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.016>
- [30] Khvorova, A. and Watts, J.K. (2017) The Chemical Evolution of Oligonucleotide Therapies of Clinical Utility. *Nature Biotechnology*, **35**, 238-248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
- [31] Wang, L., Amphlett, G., Blättler, W.A., Lambert, J.M. and Zhang, W. (2005) Structural Characterization of the Maytansinoid-Monoclonal Antibody Immunoconjugate, huN901-DM1, by Mass Spectrometry. *Protein Science*, **14**, 2436-2446. <https://doi.org/10.1110/ps.051478705>
- [32] Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M.C., Lenox, J., Cervený, C.G., *et al.* (2004) Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clinical Cancer Research*, **10**, 7063-7070. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0789>
- [33] Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., *et al.* (2012) Synthesis of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Unnatural Amino Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 16101-16106. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211023109>
- [34] Junutula, J.R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D.D., Weir, S., *et al.* (2008) Site-Specific Conjugation of a Cytotoxic Drug to an Antibody Improves the Therapeutic Index. *Nature Biotechnology*, **26**, 925-932. <https://doi.org/10.1038/nbt.1480>
- [35] Strop, P., Liu, S., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R.G., Tran, T., *et al.* (2013) Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chemistry & Biology*, **20**, 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.010>
- [36] Strop, P. (2014) Versatility of Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chemistry*, **25**, 855-862. <https://doi.org/10.1021/bc500099v>
- [37] Farias, S.E., Strop, P., Delaria, K., Galindo Casas, M., Dorywalska, M., Shelton, D.L., *et al.* (2014) Mass Spectrometric Characterization of Transglutaminase Based Site-Specific Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, **25**, 240-250. <https://doi.org/10.1021/bc4003794>
- [38] Wijdeven, M.A., van Geel, R., Hoogenboom, J.H., Verkade, J.M.M., Janssen, B.M.G., Hurkmans, I., *et al.* (2022) Enzymatic Glycan Remodeling-Metal Free Click (GlycoConnect™) Provides Homogenous Antibody-Drug Conjugates with Improved Stability and Therapeutic Index without Sequence Engineering. *mAbs*, **14**, Article ID: 2078466. <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2078466>
- [39] Li, S., Cai, H., He, J., Chen, H., Lam, S., Cai, T., *et al.* (2016) Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins during the CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chemistry*, **27**, 2315-2322. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00267>
- [40] Wu, P., Prachyathipsakul, T., Huynh, U., Qiu, J., Jerry, D.J. and Thayumanavan, S. (2023) Optimizing Conjugation Chemistry, Antibody Conjugation Site, and Surface Density in Antibody-Nanogel Conjugates (ANCs) for Cell-Specific Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, **34**, 707-718. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.3c00034>
- [41] Khongorzul, P., Ling, C.J., Khan, F.U., Ihsan, A.U. and Zhang, J. (2020) Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Molecular Cancer Research*, **18**, 3-19. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-19-0582>
- [42] Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 857-902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- [43] Bien-Ly, N., Yu, Y.J., Bumbaca, D., Elstrott, J., Boswell, C.A., Zhang, Y., *et al.* (2014) Transferrin Receptor (TFR) Trafficking Determines Brain Uptake of TFR Antibody Affinity Variants. *Journal of Experimental Medicine*, **211**, 233-244. <https://doi.org/10.1084/jem.20131660>
- [44] Chatterjee, S., Kon, E., Sharma, P. and Peer, D. (2024) Endosomal Escape: A Bottleneck for LNP-Mediated Therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **121**, e2307800120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307800120>
- [45] Wittrup, A., Ai, A., Liu, X., Hamar, P., Trifonova, R., Charisse, K., *et al.* (2015) Visualizing Lipid-Formulated siRNA Release from Endosomes and Target Gene Knockdown. *Nature Biotechnology*, **33**, 870-876. <https://doi.org/10.1038/nbt.3298>
- [46] Dowdy, S.F., Setten, R.L., Cui, X. and Jadhav, S.G. (2022) Delivery of RNA Therapeutics: The Great Endosomal Escape! *Nucleic Acid Therapeutics*, **32**, 361-368. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0004>
- [47] Sahay, G., Querbes, W., Alabi, C., Eltoukhy, A., Sarkar, S., Zurenko, C., *et al.* (2013) Efficiency of siRNA Delivery by Lipid Nanoparticles Is Limited by Endocytic Recycling. *Nature Biotechnology*, **31**, 653-658. <https://doi.org/10.1038/nbt.2614>
- [48] Erazo-Oliveras, A., Najjar, K., Dayani, L., Wang, T., Johnson, G.A. and Pellois, J. (2014) Protein Delivery into Live Cells by Incubation with an Endosomolytic Agent. *Nature Methods*, **11**, 861-867. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2998>
- [49] Dacal, M., Bradford, M.A., Plaza, C., Maestre, F.T. and García-Palacios, P. (2019) Soil Microbial Respiration Adapts to

---

Ambient Temperature in Global Drylands. *Nature Ecology & Evolution*, **3**, 232-238.

<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0770-5>

- [50] Bosgra, S., Sipkens, J., de Kimpe, S., Den Besten, C., Datson, N. and van Deutekom, J. (2019) The Pharmacokinetics of 2'-*o*-Methyl Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides: Experiences from Developing Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nucleic Acid Therapeutics*, **29**, 305-322. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0805>
- [51] Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K. and MacLachlan, I. (2005) Sequence-Dependent Stimulation of the Mammalian Innate Immune Response by Synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*, **23**, 457-462. <https://doi.org/10.1038/nbt1081>
- [52] Rickert, M., Strop, P., Lui, V., Melton-Witt, J., Farias, S.E., Foletti, D., *et al.* (2016) Production of Soluble and Active Microbial Transglutaminase in *Escherichia coli* for Site-Specific Antibody Drug Conjugation. *Protein Science*, **25**, 442-455. <https://doi.org/10.1002/pro.2833>