

Happolabiilit pallonukleiinihapot

Pro Gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Kemian laitos

Bio-orgaaninen kemia

Toni Laine

Kesäkuu 2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

LAINÉ, TONI: Happolabiilit pallonukleiinihapot

Pro Gradu -tutkielma, 38 s., 11 liites.

Kesäkuu 2021

Lähiaikoina kiinnostus oligonukleotideihin perustuviin lääkeaineisiin on kasvanut. FDA:n hyväksymiä oligonukleotidilääkkeitä oli kymmenen tammikuussa 2020, ja jotkin oligonukleotidilääkkeet ovat saaneet myyntiluvan Euroopassakin. Oligonukleotidien lääkekäytössä on kuitenkin useita haasteita. Oligonukleotidien kohdennus tiettyyn kudokseen tai solutyyppiin on haasteellista, ne eivät läpäise solukalvoa, ovat alttiita nukleaasien katalysoimalle hajotukselle ja poistuvat elimistöstä nopeasti munuaissuodatuksen kautta.

Pallonukleiinihapot (SNA, spherical nucleic acids) koostuvat keskusrakenteesta, jonka pintaan on kiinnittynyt lukuisia oligonukleotideja. SNA-rakenteilla on monia hyviä ominaisuuksia verrattuna lineaarisiin oligonukleotideihin. Ne otetaan solun sisälle tehokkaasti *scavenger A* -reseptorivälitteisellä endosytoosilla, ovat kestävämpiä nukleaaseja vastaan ja saavat aikaan pienemmän immuunivasteen kuin lineaariset oligonukleotidit.

Tämän tutkielman tavoitteena oli valmistaa happolabiileja SNA-rakenteita ja tutkia niiden hajoamisen kinetiikkaa eri pH:issa. Työ aloitettiin happolabiililla pentaerytritoliin ja asetaalirakenteisiin perustuvalla keskusrakenteella, josta yritettiin valmistaa SNA. Keskusrakenne kuitenkin hajosi liian herkästi, kun siihen kiinnitettiin oligonukleotideja, minkä seurauksena päätettiin vaihtaa lähestymistapaa. Seuraavaksi valmistettiin happolabiilin *N*-metoksioksatsolidiinilinkkerin sisältävä oligonukleotidi. Kyseisestä oligonukleotidista valmistettiin SNA liittämällä sitä C60-fullereenipohjaiseen keskusrakenteeseen. Valmistetun SNA-rakenteen hajoamisen kinetiikkaa tutkittiin pH:issa 5, 6 ja 7,4. Rakenne hajosi nopeasti pH:issa 5 ja 6, mutta oli hyvin pysyvä fysiologisessa pH:ssa 7,4. Saadut tulokset ovat lupaavia, ja verrattavissa aikaisempiin samalla linkkerillä valmistettuihin konjugaatteihin.

Avainsanat: Happolabiili, oligonukleotidi, pallonukleiinihappo, konjugaatit

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1 Terapeuttiset oligonukleotidit.....	1
1.2 Pallonukleiinihapot.....	2
1.2.1 Kultananopartikkelikeskusrakenne	6
1.2.2 Molekulaariset pallonukleiinihapot	7
1.2.3 Biohajoavat ja -yhteensopivat SNA-rakenteet.....	8
1.3 Happolabiilit linkkerit	11
1.4 Työn tarkoitus.....	13
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	14
2.1 PET-keskusrakenne	14
2.2 C60-fullereenikeskusrakenne	16
2.2.1 Oligonukleotidin synteesi	16
2.2.2 C60-fullereenikeskusrakenteisen pallonukleiinihapon synteesi	17
2.2.3 SNA-rakenteen hydrolyysin kinetiikka	20
2.3 Tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne	23
3. Materiaalit ja menetelmät.....	24
3.1 Yleiset menetelmät	24
3.2 Oligonukleotidien synteesi	24
3.2.1 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan	24
3.2.2 Oligonukleotidin ISE-U ^{NOMe} synteesi.....	25
3.2.3 <i>N</i> -metoksioksatsolidiinin muodostus.....	25
3.2.4 Fmoc-suojaryhmän irrottaminen oligonukleotidikonjugaatin aminopäästä ...	26
3.2.5 Syklo-oktyynin liittäminen oligonukleotidikonjugaattiin.....	26
3.2.6 5'-syklo-oktyyni-HEG-T6-oligonukleotidi	27
3.3 PET-keskusrakenne	28
3.3.1 4,4'-((2,2-bis((4-(dimetoksimetyyli)fenoksi)metyyli)propani-1,3-diyyli)bis-	
(oksi))bis((dimetoksimetyyli)bentseeni) (7).....	28

3.3.2 4,4'-((2,2-bis((4-(bis(3-atsidopropoksi)metyyli)fenoksi)metyyli)propani-1,3-diyyli)bis(oksi))bis((bis(3-atsidopropoksi)metyyli)bentseeni) (9)	29
3.3.3 PET-keskusrakenteen monosubstituutio.....	30
3.3.4 PET-keskusrakenteen täyssubstituutio	30
3.3.5 PET-keskusrakenteen täyssubstituutio pienmolekyyleillä.....	31
3.4 C60-fullereenikeskusrakenteisen pallonukleiinihapon synteesi.....	32
3.4.1 C60-fullereenikeskusrakenteen monosubstituutio.....	32
3.4.2 C60-fullereenikeskusrakenteen täyssubstituutio.....	33
3.5 Kinetiikkamittaukset C60-fullereenikeskusrakenteisella SNA-rakenteella	34
3.6 Tetratsiinifunktionalisoidun C60-fullereenikeskusrakenteen synteesi.....	35
3.6.1 bis(2-(2-(2-(2-(4-(6-metyyli-1,2,4,5-tetratsin-3-yyli)fenoksi)etoksi)etoksi)-etoksi)etyyli)-malonaatti (19)	35
3.6.2 Tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne (21)	36
4. Johtopäätökset ja yhteenveto	36
5. Viitteet.....	38
6. Liitteet	51

Lyhenneluettelo

FDA	Food and Drug Administration
SMA	Spinal muscular atrophy, spinaalinen lihasatrofia
ISE	Intron splicing enhancer
AR-V7	Androgen receptor variant 7
SNA	Spherical Nucleic Acid, pallomainen nukleiinihappo
PEG	Polyetyleeniglykoli
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
siRNA	Small interfering RNA, pieni häiritsevä RNA
TLR	Toll-like receptor
PET	Pentaerytritoli
POSS	polyoktaedrinen silseskvioksaani
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
DBBC	DNA-brush block copolymer
PNA	Peptidinukleiinihappo
GalNAc	<i>N</i> -asetyyliagalaktosamiini
HEG	Heksaetyleeniglykoli
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
TEA	Trietyyliamiini
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
Fmoc	Fluorenyylimetyylioksidikarbonyyli
AcOH	Etikkahappo
DIPEA	Di-isopropyylietyyliamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasetatti
AEEA	2-(2-atsidoetoksi)etoksi-etikkahappo
IEDDA	Inverse electron demand Diels–Alder
TEG	Tetraetyleeniglykoli
LCAA-CPG	Long chain alkylamine controlled pore glass
DMF	Dimetyyliformamidi
PyBOP	Bentsotriatsol-1-yylioksitripyrrolidionfosfoniumheksafluorifosfaatti
DCM	Dikloorimetaani
THF	Tetrahydrofuraani

DMTr	4,4'-dimetoksitriityli
ACN	Asetontriili
TLC	Ohutkerroskromatografia
MeOH	Metanoli
MES	2-(<i>N</i> -morfoliino)etaanisulfonihappo
HEPES	4-(2-hydroksietyyli)piperatsiini-1-etaanisulfonihappo
DBU	1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni

1. Johdanto

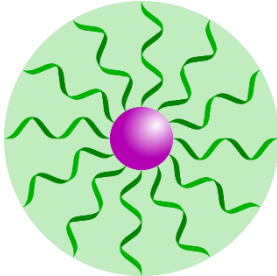
1.1 Terapeuttiset oligonukleotidit

Oligonukleotideilla on paljon potentiaalia erilaisten sairauksien hoidossa. Oligonukleotideihin pohjautuvia lääkkeitä on kehitetty esimerkiksi erilaisiin syöpiin¹⁻³ ja hermostorappeumasairauksiin⁴⁻⁶. Vuoden 2020 tammikuussa FDA:n (Food and Drug Administration) hyväksymiä oligonukleotidilääkkeitä oli kymmenen.⁷ Esimerkiksi Euroopassakin myyntiluvan saanut^{8,9} nusinerseni (spinraza) on spinaalisen lihasatrofian (spinal muscular atrophy, SMA) hoitoon kehitetty 18 nukleotidia pitkä antisense-oligonukleotidi.^{6,7} Oligonukleotidien laajemmassa lääkekäytössä on kuitenkin useita haasteita. Oligonukleotidien kohdentaminen tiettyyn solutyyppiin tai kudokseen on haasteellista^{7,10}, oligonukleotidit eivät läpäise solukalvoa kovin tehokkaasti suuren koon ja varauksen takia^{11,12} ja lisäksi elimistön nukleaasit hajottavat oligonukleotideja jo verenkierrossa.¹³ Ongelmiin on kehitetty useita ratkaisuja, kuten erilaisia kuljettimia ja kemiallisia modifikaatioita.¹⁰ Erilaiset kemialliset modifikaatiot, kuten 2'-O-modifikaatiot ja fosforotioaatit, parantavat oligonukleotidien kestävyttä nukleaaseja vastaan.^{7,10,13} Tässäkin tutkimuksessa käytetty ISE AR-V7 (intron splicing enhancer, androgen receptor variant 7)¹ on 2'-OMe-modifioitu fosforotioaatti. Lisäksi oligonukleotideihin on mahdollista tehdä modifikaatioita, jotka peittävät fosfaattien negatiiviset varaukset, ja siten parantavat oligonukleotidien solukalvon läpäisykykyä.¹⁴

Oligonukleotideja on konjugoitu moniin muihin molekyyliin, kuten esimerkiksi peptideihin¹⁵⁻¹⁷, vasta-aineisiin^{18,19}, hiilihydraatteihin^{20,21} ja nanopartikkeleihin²². Konjugaatit auttavat oligonukleotidien kohdentamisessa haluttuun kudokseen tai solutyyppiin^{17,20,21}, auttavat oligonukleotideja pääsemään solun sisälle^{15,23-25} ja voivat myös parantaa oligonukleotidien pysyvyyttä verenkierrossa.^{26,27} Oligonukleotidikonjugaatit koostuvat yleensä kolmesta osasta: itse oligonukleotidista, siihen konjugoituvasta molekyylistä, ja nämä kaksi osaa yhdistävästä linkkeristä.²⁷⁻²⁹ Linkkereitä on kahta eri tyyppiä: pysyviä ja katkeavia.²⁹⁻³¹ Tämän tutkielman kannalta katkeavat linkkerit ovat olennaisia. Ne mahdollistavat oligonukleotidien reversiibelin konjugoinnin muihin molekyyliin. Ideaalisesti katkeavat linkkerit ovat pysyviä fysiologisissa olosuhteissa, mutta katkeavat nopeasti solun sisällä esimerkiksi endosomien happamissa olosuhteissa tai sytosolin pelkistävässä olosuhteissa.^{29,32,33} Esimerkiksi hydratsoniin perustuvat linkkerirakenteet ovat happolabiileja³⁴⁻³⁶, kun taas disulfididisidokseen perustuvat linkkerirakenteet hajoavat sytosolin pelkistävässä olosuhteissa.³⁷⁻³⁹ Hyödyntämällä ortogonaalisia konjugointistrategioita oligonukleotideista on mahdollista tehdä myös bis-

konjugaatteja, joissa oligonukleotidiin on konjugoitu kaksi molekyyliä.^{31–33,40,41} Oligonukleotidiin voidaan kiinnittää esimerkiksi kudokseen kohdentava molekyyli happolabiililla linkkerillä ja endosomista poistumista helpottava molekyyli pysyvällä tai ortogonaalisesti hajoavalla linkkerillä.^{32,33}

1.2 Pallonukleiinihapot



Kuva 1. SNA:n yleinen rakenne. Keskusrakenne, jota ympäröi oligonukleotidikuori

Pallonukleiinihapot (spherical nucleic acid, SNA) ovat oligonukleotidikonjugaatteja, jotka koostuvat sopivasta haaroittavasta keskusrakenteesta, johon on kiinnittyneenä lukuisia oligonukleotideja (kuva 1).^{22,42} Oligonukleotidit ovat järjestäytyneet tiheästi keskusrakenteen pinnalle. Oligonukleotidin toinen pää on kiinni keskusrakenteessa, ja toinen pää osoittaa ulospäin.^{22,43} Oligonukleotidin toiseen päähän täytyy yleensä tehdä jokin modifikaatio, jotta ne saadaan kiinnitettyä keskusrakenteeseen.^{22,42,44} Modifikaatio voi olla esimerkiksi tioli kultananopartikkelikeskusrakenteen²² tapauksessa tai syklo-oktyyni fullereenikeskusrakenteen tapauksessa⁴². Lisäksi oligonukleotidin ja keskusrakenteen välillä on usein käsivarsirakenne, jonka tarkoituksena on siirtää oligonukleotidia kauemmas keskusrakenteesta.^{43,45,46} Käsivarsirakenne voi koostua esimerkiksi nukleiinihapoista tai polyetyleeniglykolista (PEG).^{45,46} Ensimmäisten pallonukleiinihappojen keskusrakenteena käytettiin kultananopartikkeleita²², mutta myöhemmin on käytetty useita erilaisia keskusrakenteita. Keskusrakenne voi olla epäorgaanista tai orgaanista materiaalia tai jopa näiden seosta.⁴² Keskusrakenteena on käytetty esimerkiksi hopeananopartikkeleita⁴⁴, kvanttipisteitä⁴⁷, liposomeja^{48–50}, proteiineja^{51–53} ja fullereenia⁴². Lisäksi on mahdollista syntetisoida onttoja SNA-rakenteita. Näissä oligonukleotidit on konjugoitu kultananopartikkeliin ja tämän jälkeen ristisilloitettu valokemiallisella reaktiolla. Lopulta kultakeskusrakenne on syövytetty pois syanidikäsittelyllä.⁵⁴ SNA-rakenteiden avulla voidaan kuljettaa DNA:ta^{55,56}, RNA:ta⁵⁷ ja näiden kaksoiskierteitä.^{56,58}

SNA-rakenteilla on useita hyviä puolia verrattuna lineaarisiin oligonukleotideihin. Ne läpäisevät solukalvon tehokkaasti *scavenger A* -reseptorivälitteisellä endosytoosilla (havaittu yli 50 solutyypillä).^{24,59–61} SNA:t ovat myös kestävämpiä nukleaaseja vastaan²⁶

ja aikaansaavat pienemmän immuunivasteen⁵⁷ kuin lineaariset oligonukleotidit. Lisäksi SNA-rakenteet kykenevät ainakin jossain määrin läpäisemään veri-aivoesteen. Veri-aivoesteen läpäisy ei kuitenkaan ole kovin tehokasta. Esimerkiksi eräässä glioomaa (aivokasvain) sairastavilla hiirillä tehdyssä tutkimuksessa on havaittu, että alle 1 % vereen injektoidusta SNA:sta päätyy aivoihin, ja että terveillä hiirillä SNA:n kulkeutuminen aivoihin on vielä 1000 kertaa heikompa.⁶² SNA-rakenteiden halkaisija on tyypillisesti suurempi kuin 10 nm, ja se riippuu sekä keskusrakenteen halkaisijasta että oligonukleotidin pituudesta.⁴² Munuaissuodatus on yleisesti tehokasta molekyyleille, joiden halkaisija on alle 6 nm.⁶³ Näin ollen SNA-rakenteet ovat riittävän isoja välttääkseen munuaissuodatuksen. On kuitenkin huomattavaa, että mahdollinen proteiinikorona määrittelee SNA:n lopullisen rakenteen, ja siten myös sen lääkekuljetinominaisuudet.^{24,64,65} Kaikki edellä mainitut hyödylliset ominaisuudet on havaittu kultananopartikkelikeskusrakenteisilla SNA-rakenteilla, mutta samankaltaisia ominaisuuksia on havaittu myös muilla keskusrakenteilla^{42,49} ja myös ontoilla SNA-rakenteilla⁵⁴. Tästä voidaan päätellä, että keskusrakenteen vaikutus SNA:n ominaisuuksiin on melko pieni, ja suurin osa SNA-rakenteiden ominaisuuksista on seurausta oligonukleotidikuoresta.⁴³

SNA:t otetaan soluun sisälle endosytoosilla *scavenger A*-reseptorien avulla lipidilauttojen välityksellä.^{24,59} Nanopartikkeleiden soluun ottamisen tehokkuuteen vaikuttaa esimerkiksi niiden koko ja muoto.^{66,67} SNA-rakenteiden tapauksessa soluun otton tehokkuuteen vaikuttaa myös oligonukleotidikuoren tiheys tiettyyn rajaan asti^{59,68}. Esimerkiksi erään 13 nm kultananopartikkeleista valmistetun SNA-rakenteen tapauksessa on havaittu, että 60 oligonukleotidin jälkeen SNA:n soluun otto ei kasva huomattavasti.⁶⁸ Muodon suhteen pallomaiset nanopartikkelit kulkeutuvat solun sisälle tehokkaammin kuin esimerkiksi sauvamaiset nanopartikkelit.⁶⁶ Lisäksi SNA-rakenteiden soluun otton tehokkuuteen vaikuttaa myös oligonukleotidien sekvenssi. SNA:t, joiden oligonukleotideissa on paljon guaniinia kulkeutuvat solun sisälle huomattavasti tehokkaammin kuin muita nukleoemäksiä sisältävät SNA:t.⁶⁹ On ehdotettu, että tämä perustuisi siihen, että guaniinipitoiset sekvenssit muodostavat G-kvadruplekseja^{69,70}, joita *scavenger A* -reseptorit sitovat tehokkaammin kuin yksijuosteista DNA:ta.⁷¹ Suurin merkitys endosytoosin nopeuden kannalta on keskusrakenteesta kauimpina olevilla nukleoemäksillä. Lisäämällä toistuvia GGT sekvenssejä oligonukleotidin keskusrakenteesta kauimpaan päähän voidaan parantaa SNA:n soluun kulkeutumista.⁶⁹ Solun sisällä SNA-rakenteet aikaansaavat terapeutin vasteen tunnettujen geeninhiljennysmekanismien mukaisesti, ja ne kykenevät myös toimimaan RNA-

interferenssissä.^{54,58,62,72} Dicer kykenee katkaisemaan siRNA:n (pieni häiritsevä RNA, small interfering RNA) SNA:n pinnalla^{73,74}, minkä jälkeen RNA-interferenssi etenee kanonisen mekanismin mukaisesti.⁷⁴ SNA-rakenteeseen perustuvia lääkekandidaatteja on kehitetty esimerkiksi erilaisiin ihosairauksiin^{75,76} ja syöpiin.^{62,72}

Vaikka SNA:t otetaan solun sisälle tehokkaasti endosytoosilla, ne eivät poistu endosomeista kovin tehokkaasti. Pieni osa SNA-rakenteista kuitenkin pääsee sytosoliin, ja nämä endosomeista poistuneet SNA:t aikaansaavat SNA-rakenteiden terapeutin vasteen.⁵⁵ Suurin osa molekyyleistä, jotka otetaan endosytoosilla solun sisälle, ja jotka eivät pääse endosomeista ulos, kulkeutuvat aikaisten endosomien kautta myöhäisiin endosomeihin ja sieltä lysosomeihin, missä ne hajotetaan.⁷⁷ SNA-rakenteiden on havaittu keskusrakenteesta ja oligonukleotidin sekvenssistä riippumatta kertyvän pääosin myöhäisiin endosomeihin, mistä ne eivät siirry lysosomeihin.^{55,78} Myöhäisissä endosomeissa nukleaasit lopulta hajottavat SNA:t.⁵⁵

Myös se kuinka nopeasti nukleaasit hajottavat oligonukleotideja riippuu SNA-rakenteen oligonukleotidikuoren tiheydestä. Mitä tiheämpi oligonukleotidikuori on sitä hitaammin nukleaasit hajottavat oligonukleotideja. Toinen nukleaasipysyvyyteen liittyvä tekijä on SNA-rakenteiden suuri paikallinen suolakonsentraatio.²⁶ SNA-rakenteiden oligonukleotidikuoreissa on mukana paljon kationeja (esimerkiksi Na⁺), jotka toimivat vastaaineina oligonukleotidien negatiivisesti varautuneille fosfaattiryhmille.⁷⁹ Näin ollen oligonukleotidikuoren suolakonsentraatio riippuu sen tiheydestä. Nukleaasipysyvyyden kannalta suolakonsentraatiolla on suurempi merkitys.²⁶ On ehdotettu, että tämä johtuisi siitä, että oligonukleotidikuoreissa olevat kationit korvaisivat entsyymeihin sitoutuneita kationeja, jotka ovat olennaisia entsyymin toiminnalle.^{26,80} Myös oligonukleotidin sekvenssillä on merkitystä SNA-rakenteen nukleaasipysyvyyden kannalta. Esimerkiksi peräkkäiset U- ja A-emäkset keskusrakenteen lähellä heikentävät SNA:n nukleaasipysyvyyttä.^{81,82} SNA-rakenteiden nukleaasipysyvyys on myös nukleaasikohtaista.^{26,55,83} Esimerkiksi eräissä tutkimuksissa ribonukleaasi H:n on todettu pilkkovan duplekseja SNA-rakenteen pinnalla jopa 2–3 kertaa nopeammin kuin vastaavaa vapaata dupleksia,⁸³ kun taas DNAasi I:n on todettu pilkkovan SNA-rakenteiden DNA:ta 4 kertaa hitaammin kuin vapaata DNA:ta.²⁶ Yksi mahdollinen syy tälle on entsyymien erilainen suolansietokyky.^{26,83}

Eräissä tutkimuksissa on havaittu, että SNA-rakenteet sitovat komplementaarisia sekvenssejä lineaarisia oligonukleotideja voimakkaammin.^{46,84} Asiasta löytyy kuitenkin ristiriitaista tietoa.^{85–87} Joissain tutkimuksissa muodostuneiden dupleksien on havaittu olevan pysyvämpiä ja purkautuvan (sulavan) korkeammassa lämpötiloissa^{46,54}, kun taas

toisissa on havaittu, että sulaminen tapahtuu matalammassa lämpötilassa.^{85,86} SNA-rakenteiden muodostamien dupleksien sulamisen on myös havaittu tapahtuvan kapeammalla lämpötilavälillä kuin lineaaristen oligonukleotidien.^{54,84} Sulamislämpötila laskee ja sulamisen lämpötilaväli levenee, kun SNA-rakenteen pinnalla olevien dupleksien määrä kasvaa.⁸⁷ Lisäksi on havaittu, että SNA-rakenteiden hybridisaation tasapainovakio on jopa 100 kertaa suurempi kuin lineaarisilla oligonukleotideilla.^{46,88} Korkeampi tasapainovakio johtuu kuitenkin siitä, että laskuissa SNA:ta kohdellaan yhtenä yksikkönä, vaikka sen pintaan on kiinnittyneenä useita oligonukleotideja.^{85,87,88} Jos SNA-rakenteiden hybridisaatioon liittyvät suureet normalisoidaan ottaen huomioon SNA-rakenteen kantamien oligonukleotidien määrä, suureet ovat samaa luokkaa lineaaristen oligonukleotidien kanssa.⁸⁵ Lisäksi mitä useampia oligonukleotideja SNA-rakenteeseen on hybridisoituneena sitä heikompaa^{85,87} ja hitaampaa⁸⁶ uusien oligonukleotidien hybridisaatio on. Elektrostaattinen repulsio ja steerinen este heikentävät dupleksien muodostumista.^{85,87} SNA-rakenteiden hybridisaatio on entalpian ajama prosessi ja entropian kannalta epäsuotuisa.^{46,87,88} SNA-rakenteiden muodostamien dupleksien pysyvyys riippuu useasta tekijästä, kuten oligonukleotidikuoren tiheydestä, keskusrakenteen koosta ja liuoksen suolakonsentraatiosta.⁸⁴ Mitä harvempi oligonukleotidikuori on sitä voimakkaampaa hybridisaatio on.⁸⁷ Nämä ominaisuudet tekevät SNA-rakenteista lupaavia koettimia erilaisiin diagnostisiin tarkoituksiin. Korkea tasapainovakio mahdollistaa komplementaaristen sekvenssien detektoinnin pienemmissä pitoisuuksissa verrattuna esimerkiksi fluoresenssikoettiin.⁴⁶ Lisäksi SNA-rakenteiden avulla on mahdollista erottaa komplementaarinen sekvenssi jopa yhden emäksen poikkeavista sekvensseistä.⁸⁹

Kuten muutkin SNA-rakenteiden ominaisuudet, myös alennettu immuunivaste johtuu tiheästä oligonukleotidikuoresta ja sen suuresta paikallisesta suolakonsentraatiosta. Tiheän oligonukleotidikuoren ansiosta SNA:n pinnalla olevat oligonukleotidit eivät sitoudu yhtä voimakkaasti solujen DNA:ta sitoviin proteiineihin kuin vapaat oligonukleotidit, ja immuunivaste on jopa 25 kertaa alhaisempi. Mitä tiheämpi oligonukleotidikuori, on sitä alhaisempi on SNA:n aikaansaama immuunivaste.⁵⁷ Huolimatta siitä, että SNA-rakenteiden aikaansaama immuunivaste on yleisesti pienempi kuin lineaarisilla oligonukleotideilla, SNA-rakenteita on mahdollista suunnitella aikaansaamaan immuunivaste. Tästä voi olla hyötyä erilaisissa immunoterapiahoidoissa esimerkiksi syöpää vastaan.^{50,90-92} Myös nämä SNA:t hyödyntävät SNA-rakenteiden yleisiä ominaisuuksia.⁹² Sopiva oligonukleotidisekvenssi

SNA-rakenteessa voi aktivoida elimistön TLR-reseptoreja (toll-like receptor), jotka aikaansaavat immuunivasteen.^{50,90–92}

1.2.1 Kultananopartikkelikeskusrakenne

Suurin osa SNA-rakenteista ja niiden ominaisuuksia kuvaavista havainnoista on tehty kultananopartikkelikeskusrakenteella.^{22,24,26,46,57,72,81,93} Ensimmäisissä SNA-rakenteissa käytettiin 13 nm kultananopartikkeleita.²² SNA-rakenteissa on käytetty myös esimerkiksi 15 nm^{56,93}, 50 nm⁸⁴ ja jopa 250 nm⁴⁵ nanopartikkeleita. Keskusrakenteen koko vaikuttaa oligonukleotidikuoren maksimitiheyteen. Pienemmillä keskusrakenteilla saavutetaan suurempi oligonukleotidikuoren tiheys, mutta nanopartikkelin pinnalle mahtuu vähemmän oligonukleotideja (taulukko 1).^{45,94}

Taulukko 1. Keskusrakenteen halkaisijan vaikutus siihen kiinnittyvien oligonukleotidien määrään ja oligonukleotidikuoren tiheyteen. Mukailtu lähteestä⁹⁴

keskusrakenteen halkaisija (nm)	oligonukleotideja/partikkeli	oligonukleotidikuoren tiheys (oligonukleotideja/cm ²)
10	68 ± 10	2,0 × 10 ¹³ ± 2 × 10 ¹²
15	110 ± 10	1,7 × 10 ¹³ ± 2 × 10 ¹²
20	180 ± 20	1,4 × 10 ¹³ ± 1 × 10 ¹²
30	260 ± 10	9,3 × 10 ¹² ± 8 × 10 ¹¹
40	430 ± 10	8,5 × 10 ¹² ± 4 × 10 ¹¹
50	640 ± 80	8,1 × 10 ¹² ± 3 × 10 ¹¹
60	890 ± 20	7,8 × 10 ¹² ± 1 × 10 ¹²
80	1400 ± 100	7,1 × 10 ¹² ± 9 × 10 ¹¹
100	2200 ± 200	7,1 × 10 ¹² ± 4 × 10 ¹¹
150	5100 ± 100	7,1 × 10 ¹² ± 2 × 10 ¹¹
200	8500 ± 200	6,8 × 10 ¹² ± 1 × 10 ¹²

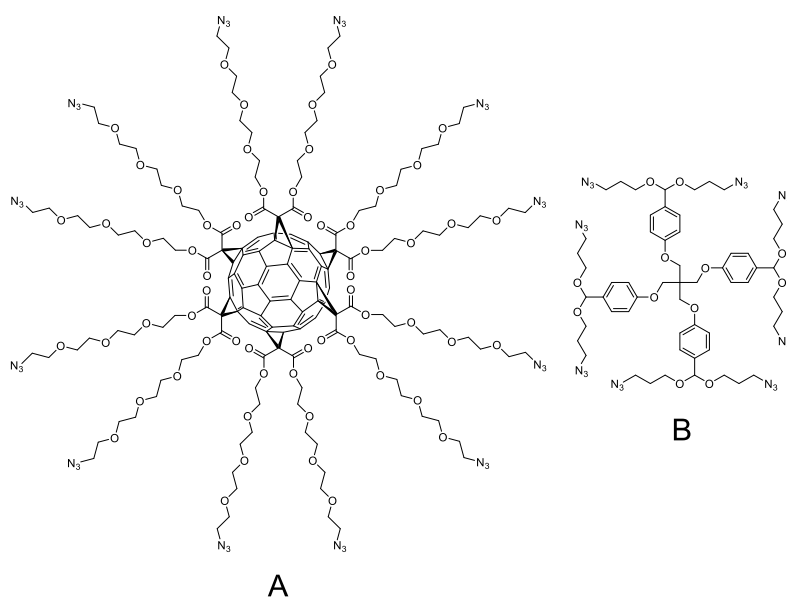
Oligonukleotidien kiinnittäminen kultananopartikkeliin tehdään yleisimmin alkyylitiomodifikaation^{22,43,46,95} avulla, mutta myös esimerkiksi disulfideja⁹⁶ on käytetty. Tyypillisesti oligonukleotidit liitetään keskusrakenteen pintaan vesiliuoksessa, jonka suolapitoisuutta kasvatetaan ajan myöten. Prosessia kutsutaan suolalla ikäännyttämiseksi.^{45,94,95} Suurempi suolakonsentraatio synteesin aikana mahdollistaa tiheämpien SNA-rakenteiden synteesin, sillä positiivisesti varautuneet vastaionit vähentävät oligonukleotidien välisiä hylkimisvoimia.⁴⁵ Lisäksi oligonukleotidin ja keskusrakenteen välissä on yleensä käsivarsirakenne, jolla saadaan etäisyyttä oligonukleotidin ja keskusrakenteen välille.^{45,46} Käsivarsirakenteen valinnalla on myös vaikutusta konjugaation saantoon.^{45,97} Mahdollinen käsivarsirakenteen tai kiinnitettävän

oligonukleotidin vuorovaikutus keskusrakenteen kanssa voi heikentää saantoa.^{45,97,98} Esimerkiksi adensiinin affiniteetti kultaa kohtaan on suurempi kuin tymidiinillä^{98,99}, jonka on todettu vaikuttavan epäsuotuisasti SNA-rakenteiden kokoamiseen.^{45,97}

Useat nanomateriaalit ovat toksisia^{100–103}, ja onkin huomattavaa, että SNA-rakenteiden ei ole havaittu olevan toksisia.^{56,61,104} SNA-rakenteissakin käytetyillä kultananopartikkeleilla itsessään on havaittu sytotoksisuutta.¹⁰³ Kultananopartikkeleiden toksisuus riippuu useasta eri tekijästä kuten niiden koosta¹⁰³, muodosta¹⁰⁵ ja pintakemiasta¹⁰¹. Pienet kultananopartikkelit (halkaisija < 2 nm) ovat akuutisti sytotoksisia, kun taas 15 nm kultananopartikkelit eivät ole akuutisti toksisia edes 6300 µM konsentraatiossa.¹⁰³ Nanopartikkelien pitkäaikaisista terveysvaikutuksista ei kuitenkaan vielä ole kunnolla tietoa,^{106,107} mutta joissain tutkimuksissa kultananopartikkeleilla on havaittu lieviä haittavaikutuksia.^{107,108} Keskusrakenteiden mahdolliset haittavaikutukset on syytä ottaa huomioon, koska ne ovat todennäköisiä tuotteita SNA-rakenteiden metabolisessa hajoamisessa.⁵⁴

1.2.2 Molekulaariset pallonukleiinihapot

SNA-rakenteet eivät yleensä ole homogeenisiä, sillä niiden koko ja oligonukleotidikuoren tiheys vaihtelevat.^{45,68,94,97} Kyseessä on siis tietynlaisten rakenteiden populaatio, eli polydispersi seos. Molekulaarisilla pallonukleiinihapoilla on määritelty tunnettu rakenne, kuten esimerkiksi tämänkin tutkimustavoitteen C60-fullereeniin ja pentaerytritoliin (PET) pohjautuvilla SNA-rakenteilla (kuva 2). Toisin kuin kultananopartikkeleilla, näillä orgaanisilla keskusrakenteilla SNA-rakenteiden kokoa ja oligonukleotidikoostumusta voidaan kontrolloida tarkasti.⁴²

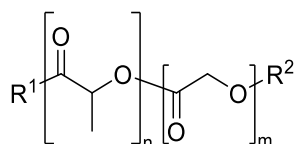


Kuva 2. Tässä tutkimuksessa käytetyt molekulaariset keskusrakenteet: A) C60-fullereenikeskusrakenne⁴², B) PET-keskusrakenne

Tässä tutkimuksessa käytetty atsidifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne on aikaisemmin julkaistu rakenne.⁴² Samassa tutkimuksessa käytettiin myös atsidifunktionalisoitua polyoktaedristä silseskvioksaanikeskusrakennetta (POSS).⁴² Oligonukleotidien konjugointi keskusrakenteisiin perustuu atsidin ja syklo-oktyynin väliseen kuparivapaaseen sykloadditioreaktioon (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC).^{42,109} Keskusrakenne sisältää atsidiryhmän ja oligonukleotidi syklo-oktyynin. C60-keskusrakenteeseen saadaan kiinnitettyä 12 oligonukleotidia, kun taas POSS- ja PET-keskusrakenteisiin saadaan liitettyä vain kahdeksan. Sekä C60- että POSS-keskusrakenteisella pallonukleiinihapolla on havaittu muihin SNA-rakenteisiin, kuten kultananopartikkelikeskusrakenteisiin pallonukleiinihappoihin, verrattavia ominaisuuksia. Molekulaariset pallonukleiinihapot ovat kestävämpiä nukleaaseja vastaan kuin lineaariset oligonukleotidit. Lisäksi ne kulkeutuvat solun sisälle tehokkaasti. Tiheämmän oligonukleotidikuoren ansiosta C60-keskusrakenteiset pallonukleiinihapot kulkeutuvat tehokkaammin solun sisälle ja ovat kestävämpiä nukleaaseja vastaan kuin POSS-keskusrakenteiset pallonukleiinihapot. Kumpikin pystyy estämään geenin ekspansion solussa. Solulinjassa antisense-oligonukleotideilla tehdyissä kokeissa on havaittu, että C60-fullereenikeskusrakenteinen SNA kykenee vähentämään HER2:n (human epidermal growth factor receptor 2) ekspressiota 81 %, kun taas POSS-keskusrakenteinen SNA vain 15 %.⁴²

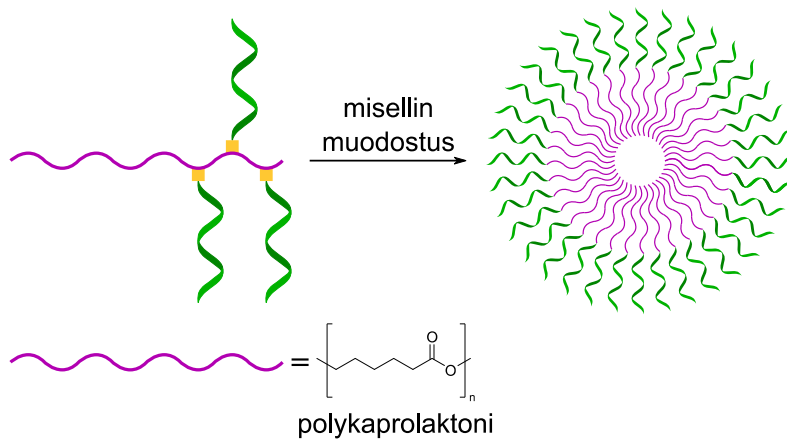
1.2.3 Biohajoavat ja -yhteensopivat SNA-rakenteet

Lähiaikoina kiinnostus erilaisiin biohajoaviin ja -yhteensopiviin SNA-rakenteisiin on kasvanut.^{49,51,78,110–115} Tällaisilla SNA-rakenteilla pystytään välttämään keskusrakenteeseen liittyvät haittavaikutukset solun toimintaan.⁵⁵ Bioyhteensopivalla SNA:lla tarkoitetaan SNA-rakennetta, joka on biohajoava^{78,110–112} tai jonka keskusrakenne on biomolekyyli, kuten liposomi^{48,49,113} tai proteiini^{51,114,115}. Myös ontot SNA-rakenteet^{54,116} lasketaan bioyhteensopiviksi. Biohajoavat SNA-rakenteet hajoavat biologisissa olosuhteissa joko itsestään¹¹² tai jonkin ulkopuolisen ärsykkeen, esimerkiksi pH:n⁷⁸, entsyymien^{78,110} tai valon¹¹¹, vaikutuksesta. Biohajoavissa SNA-rakenteissa on käytetty esimerkiksi PLGA-polymeeriä¹¹⁰ (poly(lactic-co-glycolic acid)), polykarbamaattiin perustuvaa keskusrakennetta¹¹² ja DBBC-rakenteeseen (DNA-brush block copolymer) perustuvaa misellirakennetta⁷⁸.



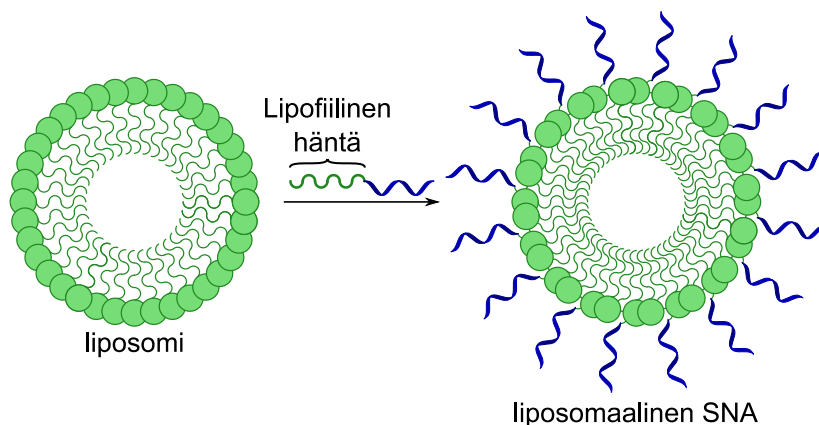
Kuva 3. PLGA:n rakenne. Mukailtu lähteestä¹¹⁰

PLGA-SNA koostuu atsidimodifioidusta PLGA-polymeeristä (kuva 3), johon oligonukleotidit kiinnitetään SPAAC-reaktiolla. Oligonukleotidien vapautuminen PLGA-rakenteesta tapahtuu PLGA:n esteriselkärangan hydrolyysin kautta. Hajoamisen puoliintumisajat PLGA-SNA-rakenteille seerumissa ovat 2–3 h.¹¹⁰ Hajoaminen on hitaampaa kuin monilla liposomaalisilla SNA-rakenteilla⁵⁰, mutta silti melko nopeaa. PLGA-SNA-rakenteilla on havaittu SNA-rakenteille tyypillisiä ominaisuuksia. Ne kulkeutuvat solun sisälle tehokkaasti ja ovat kestävämpiä nukleaaseja vastaan kuin lineaariset oligonukleotidit. Lisäksi PLGA:n biohajoavuuden ansiosta rakenteet eivät ole sytotoksisia.¹¹⁰



Kaavio 1. DBBC-SNA:n muodostuminen⁷⁸

DBBC-SNA-rakenteet valmistetaan kiinnittämällä useita oligonukleotideja atsidimodifioituun polykaprolaktoniin SPAAC-reaktiolla. Vesiliuoksessa näistä konjugaateista rakentuu misellejä, jotka muodostavat SNA-rakenteen (kaavio 1). DBBC-SNA:t kulkeutuvat tehokkaasti soluun ja pystyvät estämään geenin ekspansion solussa. Niiden hajoaminen on pH-riippuvainen prosessi, ja ne hajoavat matalissa pH:issa nopeammin. DBBC-SNA:t hajoavat myös seerumissa. DBBC-SNA-rakenteilla ei ole havaittu merkittävää sytotoksisuutta.⁷⁸



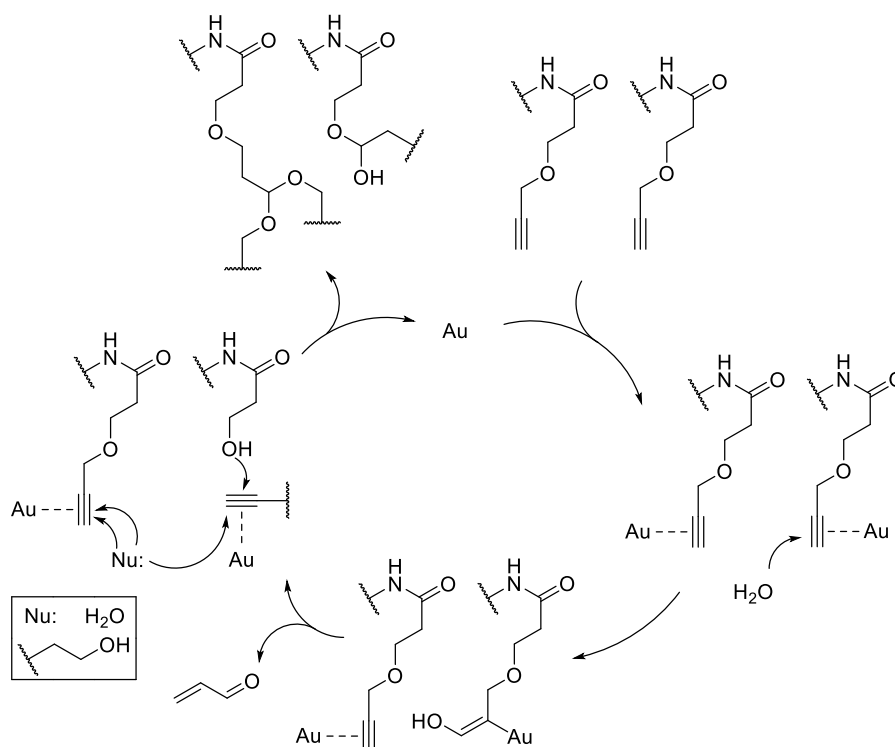
Kaavio 2. Liposomaalisen SNA:n muodostuminen⁴⁹

Liposomaalisissa SNA-rakenteissa oligonukleotidien kiinnitys liposomiin perustuu hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. Oligonukleotidin toiseen päähän täytyy liittää lipofiilinen häntä, joka interkaloituu liposomin fosfolipidien väliin (kaavio 2).^{49,50} Koska oligonukleotidin kiinnitys liposomiin ei ole kovalenttinen, liposomaalisissa SNA-rakenteissa on vaarana rakenteen enneaikainen purkautuminen. Hydrofobisemman hännän avulla liposomaalisista SNA-rakenteista saadaan huomattavasti pysyvämpiä seerumissa.⁵⁰ Liposomaaliset SNA-rakenteet kulkeutuvat solun sisälle tehokkaasti endosytoosilla.^{49,50} Lisäksi ne voivat aikaansaada terapeuttisen vasteen solussa. Ne eivät myöskään ole sytotoksisia.⁴⁹

Proteiini-SNA-rakenteissa oligonukleotidit kiinnitetään proteiiniin SPAAC-reaktiolla. Proteiinin amiiniryhmiin voidaan liittää jonkin linkkerin välityksellä atsidi, johon syklo-oktyynimodifioidut oligonukleotidit voidaan liittää.^{51-53,115} Myös proteiini-SNA:t otetaan solun sisälle tehokkaasti endosytoosilla.^{51,52} Eräässä tutkimuksessa⁵² solun sisälle kulkeutumisen tehokkuuteen on havaittu vaikuttavan esimerkiksi proteiinin ja oligonukleotidien välisen linkkerin rakenne. Esimerkiksi β -galaktosidaasiin perustuvan SNA-rakenteen on havaittu kulkeutuvan solun sisälle tehokkaammin, kun PEG-linkkeri on lyhyempi. Lisäksi on havaittu, että kulkeutuminen soluun on tehokkaampaa, kun PEG-linkkeri korvataan DNA-pohjaisella linkkerillä.⁵² Proteiini-SNA-rakenteilla ei ole havaittu sytotoksisuutta.⁵¹ Proteiini-SNA:ta voidaan hyödyntää myös terapeuttisesti aktiivisten proteiinien kuljetuksessa.^{51,52} Niiden on havaittu olevan pysyvämpiä veressä kuin modifioimattomat proteiinit.⁵² Lisäksi on havaittu, että proteiini-SNA-rakenne otetaan solun sisälle tehokkaammin kuin modifioimaton proteiini, ja esimerkiksi β -galaktosidaasin tapauksessa entsyymin aktiivisuuden on havaittu säilyvän oligonukleotidikuoresta huolimatta.^{51,52}

Onttoja SNA-rakenteita on toistaiseksi julkaistu kaksi erilaista. Yhteistä kummallekin on se, että kultananopartikkeliä käytetään templaattina oligonukleotidikuoren muodostukselle. Sopivan ristisilloitusreaktion jälkeen kultakeskusrakenne voidaan liuottaa, ja tuloksena saadaan ontto SNA-rakenne.^{54,116} Toinen strategioista hyödyntää propargyylieetterimodifioituja oligonukleotideja.⁵⁴ Propargyylieetterit sitoutuvat kultananopartikkelin pintaan, missä propargyylieetterit reagoivat keskenään muodostaen asetaalisidoksilla polymeeriverkoston (kaavio 3). Polymerisaation jälkeen kultakeskusrakenne liuotetaan kaliumsyanidiliuoksella.^{54,117} Tällä metodilla valmistetuilla pallonukleiinihapoilla on huomattavasti tiheämpi oligonukleotidikuori kuin perinteisillä kultananopartikkelikeskusrakenteisilla SNA-rakenteilla.⁵⁴ Toisessa strategiassa kultananopartikkeli pinnoitetaan silikalla, joka on

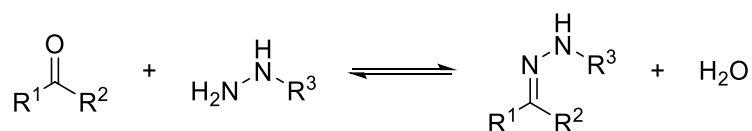
funktionalisoitu maleimidiryhmillä. Tiolimodifioidut oligonukleotidit reagoivat maleimidien kanssa, ja kiinnittyvät silikan pintaan. Tämän jälkeen kultakeskusrakenne liuotetaan jodilla.¹¹⁶ Kummatkin näistä pallonukleiinihapoista otetaan solun sisälle tehokkaasti ja kummatkin kykenevät estämään geenin ekspression solussa.^{54,116} Kumpikaan ei myöskään ole sytotoksinen^{54,116}, ja silikarakenne on lisäksi biohajoava.^{116,118}



Kaavio 3. Propargyylieetterien polymerisaatiolle ehdotettu mekanismi. Mukailtu lähteestä¹¹⁷

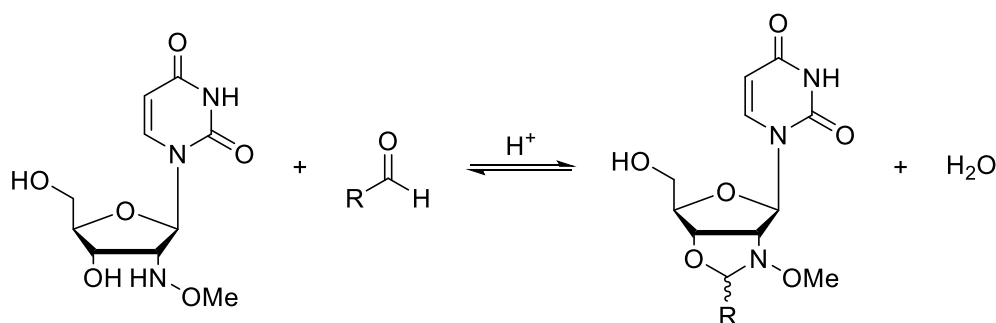
1.3 Happolabiilit linkkerit

Monien oligonukleotidikonjugaattien kulkeutuminen endosomista sytosoliin on vaikeaa. Pääosa konjugaateista kulkeutuu endosomeista lysosomeihin, missä ne hajotetaan.^{18,119} Esimerkiksi vasta-ainekonjugaatit eivät pääse ulos endosomeista, ja päätyvät lysosomiin.^{18,120} Näin ollen voi olla eduksi, jos oligonukleotidin ja siihen konjugoidun molekyylin välinen sidos purkautuu endosomissa. Happolabiilit linkkerit ovat rakenteita, jotka hajoavat alhaisen pH:n vaikutuksesta esimerkiksi endosomissa (pH = 5,5–6,2) tai lysosomissa (pH = 4,5–5,0). Ideaalisesti happolabiilit linkkerit ovat pysyviä fysiologisessa pH:ssa 7,4, mutta hajoavat nopeasti alhaisessa pH:ssa.²⁹ Linkkerin purkautuessa oligonukleotidi ja siihen konjugoitu molekyyli irtoavat toisistaan. Yleisimpiä happolabiileja linkkereitä ovat hydratsonit.^{28,29,121–123} Lisäksi tässä osiossa käydään läpi tässä tutkimuksessa käytettyä *N*-metoksioksatsolidiinirakennetta.^{32,33}



Kaavio 4. Hydratsonin muodostuminen ketonin tai aldehydin ja hydratsiin välillä.¹²⁴

Hydratsonit ovat happolabiileja yhdisteitä, jotka muodostuvat hydratsiin reagoissa aldehydin tai ketonin kanssa. Hydratsonin muodostuminen on esitetty kaaviossa 4.¹²⁴ Yleensä aldehydimodifikaatio tehdään oligonukleotidiin, ja siihen konjugoitavaan molekyyliin tehdään hydratsiinimodifikaatio.^{28,34,121,123} Aldehydimodifikaatio on mahdollista tehdä oligonukleotidin kumpaankin päähän.¹²³ Hydratsonia on hyödynnetty esimerkiksi oligonukleotidien peptidi-³⁴ ja vasta-ainekonjugaateissa^{28,123}. Pienmolekyyleillä on havaittu, että hydratsoniligaatiossa käytettyjen karbonyyliyhdisteen ja hydratsiin sivuketjuilla on vaikutusta hydrolyysin nopeuteen.^{125,126} Monet hydratsonit ovat hyvin pysyviä fysiologisessa pH:ssa.^{126,127} Esimerkiksi erään vasta-aine-peptidikonjugaatin puoliintumisaika pH:ssa 5 on 4,4 h, mutta 183 h pH:ssa 7,4 (kumpikin 37 °C:ssa).¹²⁷



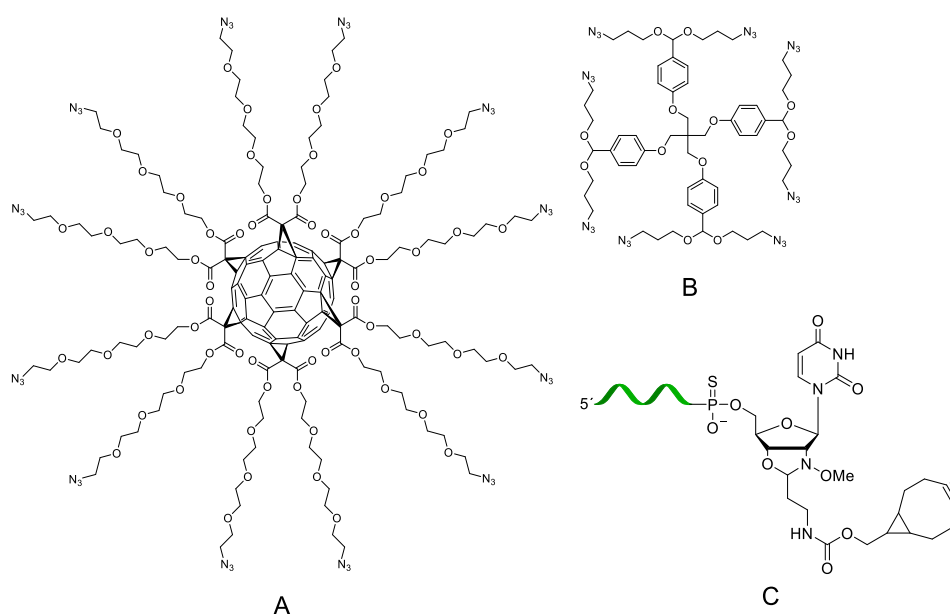
Kaavio 5. *N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin ja aldehydin välillä.^{32,33}

N-metoksioksatsolidiini muodostuu β -hydroksi-*N*-metoksialkyyliamiinin ja aldehydin välisessä reaktiossa. Tuotteena muodostuu *R*- ja *S*-isomeerien seos. Konjugaatiossa käytettävä oligonukleotidi voi olla 2'-deoksi-2'-*N*-(metoksiamino)uridiinimodifioitu, joka reagoi aldehydimodifioidun konjugaattirakenteen kanssa (kaavio 5).^{32,33} 2'-deoksi-2'-*N*-(metoksiamino)uridiinimodifioituja oligonukleotideja voidaan valmistaa automatisoidusti hyödyntäen kantajaan immobilisoitua 2'-deoksi-2'-*N*-(metoksiamino)uridiinia.³² 2'-deoksi-2'-*N*-(metoksiamino)uridiini jää oligonukleotidin 3'-päähän. *N*-metoksioksatsolidiinia on hyödynnetty esimerkiksi oligonukleotidien peptidi-, PNA- ja GalNAc-konjugaattien (PNA = peptidinukleiinihappo, GalNAc = *N*-asetyyli galaktosamiini) valmistuksessa.^{32,33} Pienmolekyyleillä tehdyissä kokeissa *N*-metoksioksatsolidiinin hydrolyysin nopeuden on havaittu riippuvan aldehydin sivuketjusta.³² Lisäksi oligonukleotidien

peptidikonjugaateilla on havaittu, että konjugaattien hajoamisnopeus riippuu peptidin aldehydimodifikaatiosta. Gly-H-aldehydillä modifioidulla peptidillä valmistetut konjugaatit hajoavat hitaammin kuin β -Ala-H-aldehydillä (yhden hiiliatomin pidempi linkkeri) valmistetut.³³ Esimerkiksi pH:ssa 5 ja lämpötilassa 37 °C oligonukleotidi-peptidikonjugaattien hydrolyysin puoliintumisajat ovat 4–40 h^{32,33}, joista β -Ala-H-aldehydillä tehtyjen konjugaattien puoliintumisajat ovat alle 12 h. *N*-metoksioksaatsolidiinit ovat melko pysyviä fysiologisessa pH:ssa 7,4.³³

1.4 Työn tarkoitus

Tämän työn tarkoituksena oli valmistaa happolabiileja pallonukleiinihapporakenteita ja tutkia niiden hajoamista eri pH:issa. Aiemmista biohajoavista SNA-rakenteista^{78,110,112} poiketen tässä tutkielmassa käytetyt SNA-rakenteet ovat molekulaarisia. Oligonukleotidien kiinnitys keskusrakenteeseen on kovalenttinen, ja oligonukleotidien irtoaminen keskusrakenteesta perustuu niiden väliseen happolabiiliin linkkerirakenteeseen. Lopullisena tavoitteena on tehdä solukokeita, joissa happolabiilia rakennetta verrataan vastaavaan hajoamattomaan rakenteeseen, ja tutkitaan hajoamisen vaikutusta oligonukleotidien kulkeutumiseen sytosoliin. Hypoteesina on, että SNA-rakenteen avulla oligonukleotidit voidaan kuljettaa endosomiin, missä happolabiilin linkkerin ansiosta oligonukleotidit irtoavat keskusrakenteesta, mikä helpottaa niiden kulkeutumista sytosoliin.



Kuva 4. Tutkielmassa käytettyjä rakenteita: A) C60-fullerenenikeskusrakenne⁴², B) PET-keskusrakenne, C) käytetty oligonukleotidijohdos

Työ aloitettiin happolabiililla asetaalirakenteisiin perustuvalla PET-keskusrakenteella (kuva 4B), mutta rakenne osoittautui odotettua pysymättömämmäksi.

oktyyini-HEG-T6-oligonukleotidia (**ON5**). Reaktio tehtiin DMSO:n ja veden seoksessa. Samaa reaktiota yritettiin myös lisäämällä reaktioseokseen trietyyliamiinia (TEA), jotta seos olisi emäksinen. Reaktioiden annettiin olla huoneenlämmössä. Trietyyliamiinia sisältävästä reaktioseoksesta otettiin näyte, joka analysoitiin massaspektrometrillä. Tuotetta havaittiin muodostuneen. Reaktioseokset puhdistettiin RP-HPLC:llä. Kerätyt fraktiot kylmäkuivattiin, ja analysoitiin massaspektrometrillä. Haluttua tuotetta ei havaittu. Reaktio tehtiin vielä kolmannen kerran trietyyliamiinin kanssa, mutta HPLC-fraktioihin lisättiin heksyyliamiinia ennen kylmäkuivausta. Fraktioissa havaittiin haluttua tuotetta, mutta myös hajonnutta tuotetta. Tämän jälkeen pallonukleiinihappoa yritettiin tehdä täyssubstituution kautta (tuote **11**). Reaktio tehtiin DMSO:n ja veden seoksessa, johon lisättiin vielä heksyyliamiinia. Reaktiota sekoitettiin tasoravistelijassa. HPLC-puhdistuksen jälkeen tässäkään reaktiossa ei havaittu tuotetta. Tulokset on koottu taulukkoon 2.

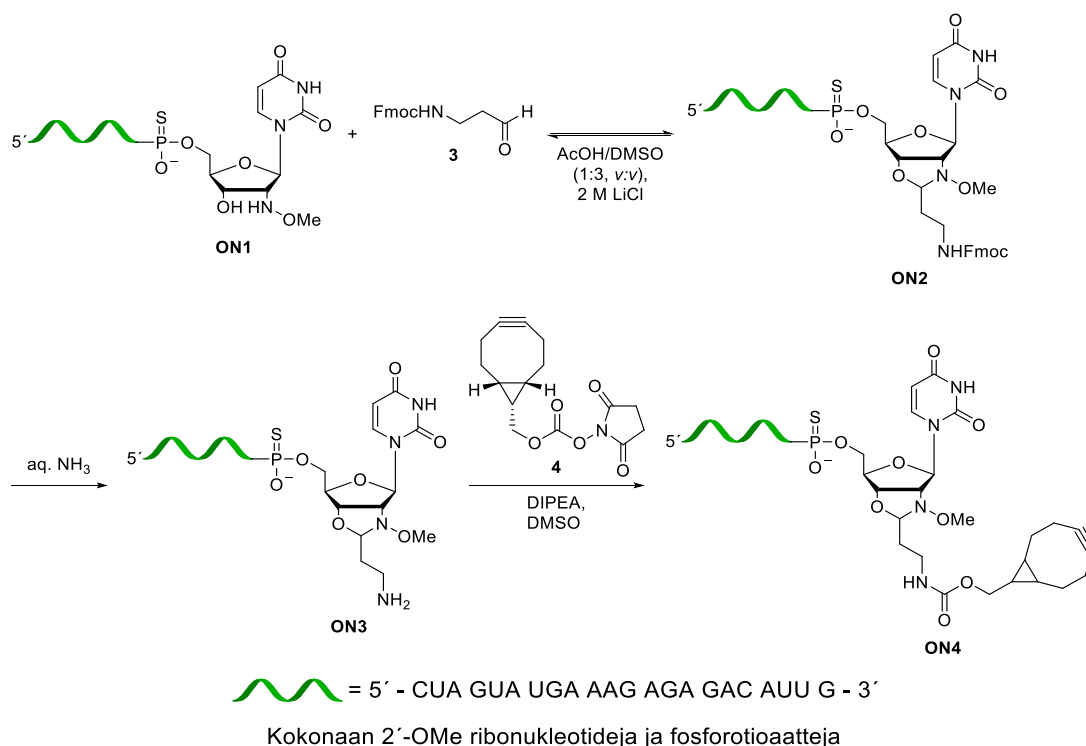
Taulukko 2. PET-keskusrakenteen substituutioreaktioiden tulokset

	Reaktio-olosuhteet	Muuta	Tulokset
Reaktio 1	DMSO/vesi	monosubstituutio	Tuote hajosi
Reaktio 2	DMSO/vesi + TEA	monosubstituutio	Reaktioseoksessa havaittiin tuotetta, hajosi puhdistuksessa
Reaktio 3	DMSO/vesi + TEA	monosubstituutio, heksyyliamiinia	Osa tuotteesta hajosi kylmäkuivauksessa
Reaktio 4	DMSO/vesi + heksyyliamiini	Täyssubstituutio, massaspektri ilman kylmäkuivausta	Tuotetta ei havaittu

Haluttiin selvittää johtuuko hajoaminen mahdollisesti oligonukleotidista, joten täyssubstituutiota yritettiin (1*R*,8*S*,9*s*)-bisyklo[6.1.0]-non-4-yn-9-yyylimetanolilla (**12**) (tuote **13**). DMSO:iin liuotetut PET-keskusrakenne ja yhdiste **12** pipetoitiin mikrosentrifugiputkeen, ja reaktion annettiin olla huoneenlämmössä 16 h. Reaktio puhdistettiin RP-HPLC:llä, ja kerätyt fraktiot kylmäkuivattiin. Tuote **13** onnistuttiin eristämään puhtaana. Tämä viittaisi siihen, että hajoaminen liittyy jotenkin oligonukleotideihin, mahdollisesti niiden fosforihapporyhmien happamuuteen. Oligonukleotidien kanssa rakenne vaikutti kuitenkin hajoavan liian herkästi, minkä seurauksena PET-keskusrakenne päätettiin hylätä.

2.2 C60-fullereenikeskusrakenne

2.2.1 Oligonukleotidin synteesi

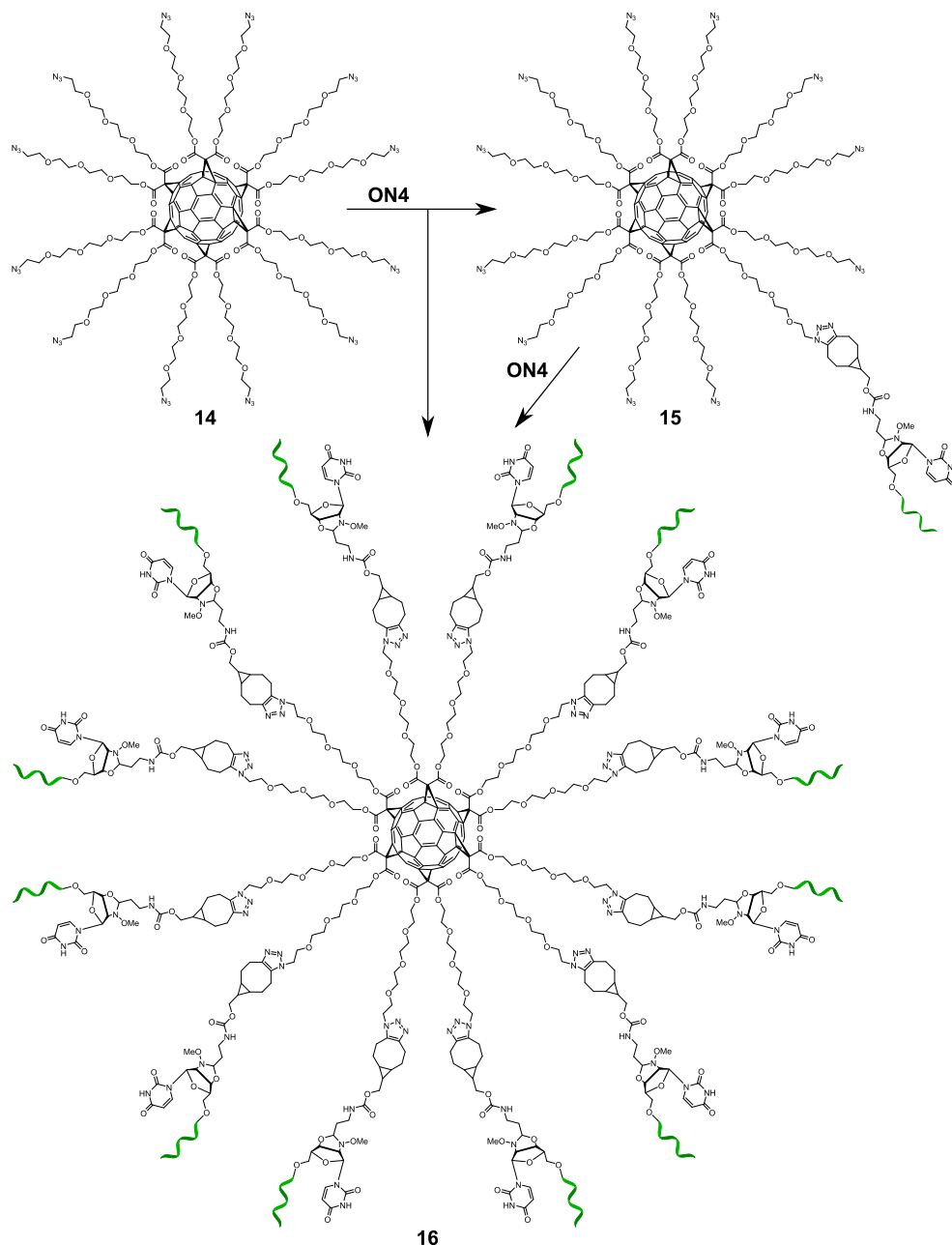


Kaavio 7. Oligonukleotidin **ON4** synteesikaavio

Oligonukleotidi ISE- U^{NOMe} (**ON1**) syntetisoitiin 1 μmol :n skaalalla kiinteällä kantajalla, johon oli immobilisoitu 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini. **ON1** irrotettiin kantajalta ammoniakkin väkevällä vesiliuoksella, ja puhdistettiin RP-HPLC:llä. **ON4** syntetisoitiin kaavion 7 mukaisesti kolmessa vaiheessa. *N*-metoksioksatsolidiini muodostettiin ensimmäisessä vaiheessa aiemmin julkaistua protokollaa³² mukaillen. Fmoc- β -Ala-H (**3**) ja **ON1** liuotettiin AcOH/DMSO-seokseen (1:3, *v:v*), jossa oli lisäksi 2 M LiCl. Liuosta inkuboitiin uunissa (55 °C) 1,5 h. Reaktioseos puhdistettiin RP-HPLC:llä. Tuotteena saatiin **ON2** 55 % saannolla. Toisessa vaiheessa konjugaatin aminopäästä poistettiin Fmoc-suojaryhmä. **ON2** liuotettiin ammoniakkin väkevään vesiliuokseen, ja liuosta inkuboitiin huoneenlämmössä 4 h. Reaktioliuosta pestiin dikloorimetaanilla. Tuote **ON3** jäi vesifaasiin, joka kylmäkuivattiin. Aivan kaikki Fmoc ei irronnut ammonolyysin aikana, ja saatu tuote sisälsi myös pienen määrän **ON2**:ta epäpuhtautena. Viimeisessä vaiheessa oligonukleotidikonjugaattiin liitettiin syklo-oktyyni. **ON3**, (1*R*, 8*S*, 9*s*)-bisyklo[6.1.0]non-4-yn-9-yyli)metyyli-*N*-sukkinimidyyl-karbonaatti (**4**) ja DIPEA liuotettiin DMSO:iin. Reaktioon annettiin olla huoneenlämmössä, ja sitä seurattiin RP-HPLC:llä. Valmis reaktio puhdistettiin RP-

HPLC:llä. Tuotteena saatiin **ON4** 60 % saannolla. **ON1**:stä alkaen oligonukleotidisynteesin saanto oli kokonaisuudessaan 33 %.

2.2.2 C60-fullereenikeskusrakenteisen pallonukleiinihapon synteesi



Kaavio 8. Havainnollistava kuva C60-fullereenikeskusrakenteisen pallonukleiinihapon synteesistä. SNA (**16**) voidaan syntetisoida joko suoraan C60-fullereenikeskusrakenteesta (**14**) täyssubstituutiolla tai monosubstituution (**15**) kautta liittämällä ensin vain yksi oligonukleotidi.

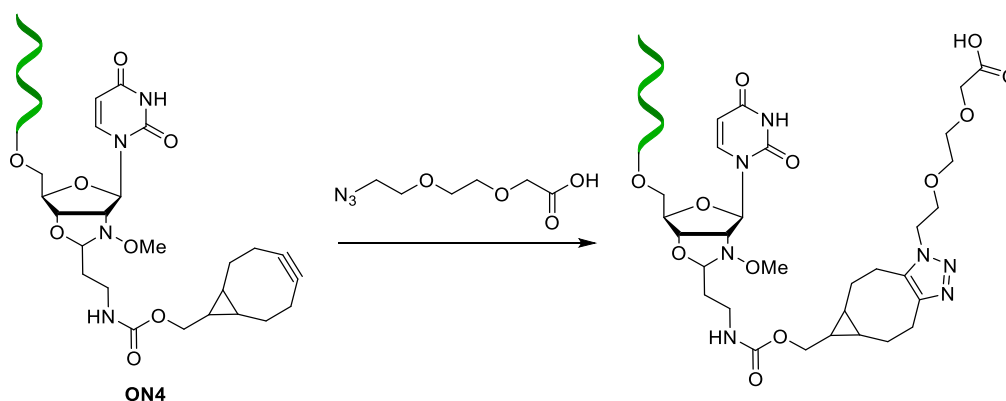
Pallonukleiinihapon synteesiä yritettiin useissa eri olosuhteissa. Ensin tehtiin monosubstituutio, jossa C60-fullereenikeskusrakenteeseen (**14**, kaavio 8) liitettiin vain yksi oligonukleotidi. C60-fullereenikeskusrakenteeseen ja **ON4** liuotettiin vesi/DMSO-seokseen (n. 90 % DMSO). Reaktioon annettiin olla huoneenlämmössä 16 h, minkä jälkeen se puhdistettiin RP-HPLC:llä. Tuotteena saatiin **15** 37 % saannolla. Saatu tuote oli vesiliukoinen.

Taulukko 3. Täyssubstituutioreaktioissa käytetyt olosuhteet

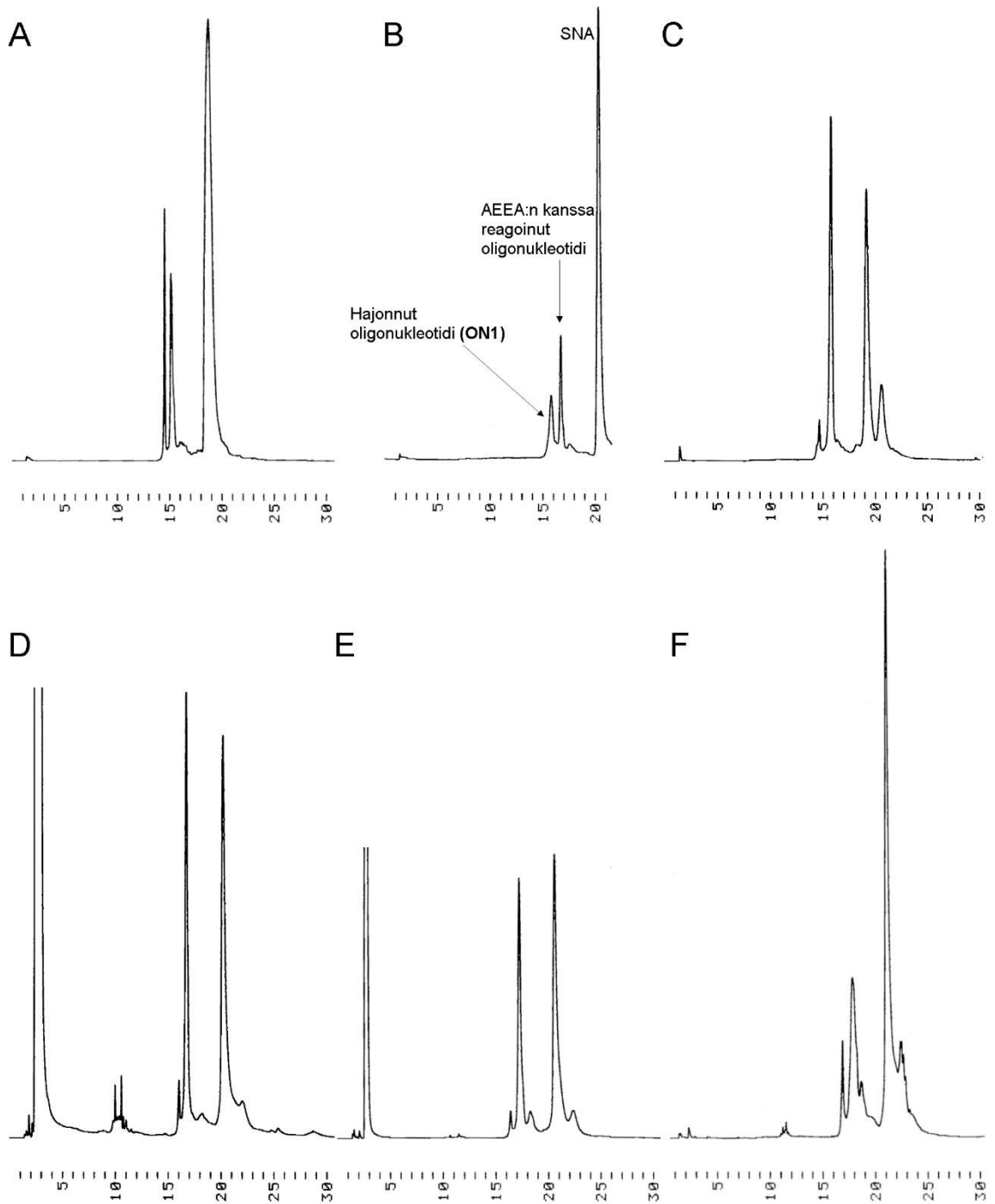
Liuotin	c(keskusrakenne) / μ M	c(ON4) / μ M
TEAA-puskuri ^a (100 mM; pH=7,6)	37,0 ^d	445
Fosfaattipuskuri ^b (100 mM; pH=7,5)	171 ^d	2740
DMSO ^c	70,0 ^e	1380
DMSO/H ₂ O ^c (1:1, v:v)	70,0 ^e	1380
kuiva DMSO ^c	78,0 ^e	1570
kuiva DMSO/pyridiini ^c (90:10, v:v)	78,0 ^e	1570
kuiva pyridiini ^c	78,0 ^e	1570

Reaktioliuoksissa käytetyt suolat ja niiden konsentraatiot olivat: a) 1,5 M NaCl, b) 0,8 M NaCl ja c) 2,0 M LiCl. Synteetit on tehty käyttäen d) monosubstituutiotuotetta (**15**) tai e) C60-fullereenikeskusrakennetta (**14**)

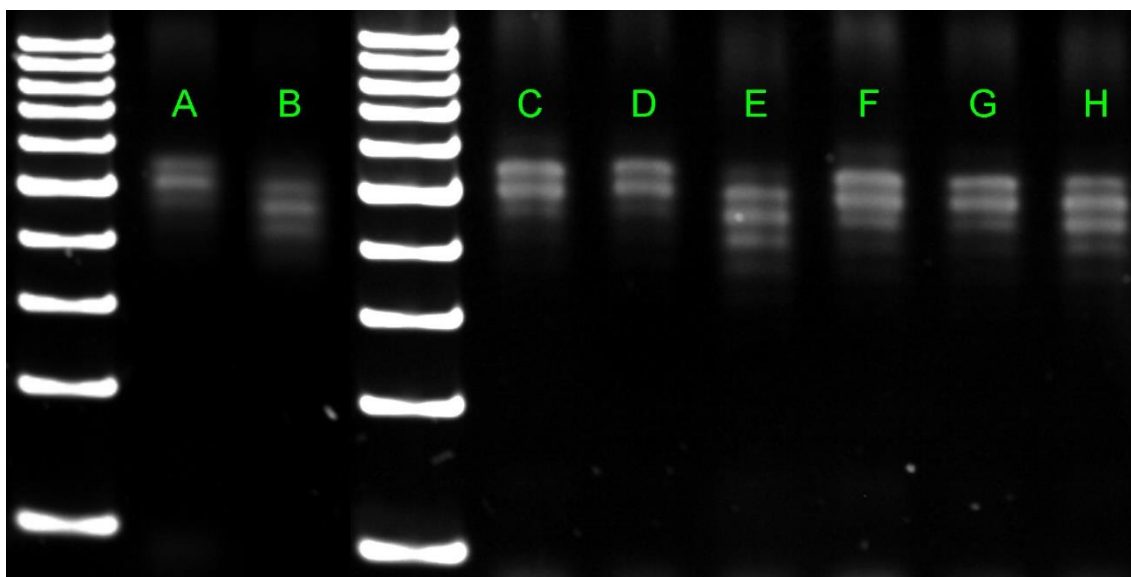
Täyssubstituutiota yhdisteelle **15** yritettiin TEAA- ja natriumfosfaattipuskureissa. SNA-rakennetta yritettiin myös valmistaa täyssubstituutiolla suoraan C60-fullereenikeskusrakenteesta (**14**) erilaisissa DMSO/pyridiiniseoksissa. Erilaiset täyssubstituutio-olosuhteet on esitetty taulukossa 3. Lähtöaineet pipetoitiin mikrosentrifugiputkeen ja kylmäkuivattiin. Haihdutusjäännökset liuotettiin taulukossa 3 mainittuihin liuottimiin, ja reaktioiden annettiin olla huoneenlämmössä. Reaktioita seurattiin RP-HPLC:llä ja geelielektroforeesilla. Reaktioseoksissa havaittiin *N*-metoksioksatsolidiinilinkkerin hajoamista halutun reaktion lisäksi, ja seoksista onnistuttiin eristämään SNA:n lisäksi hajoamisessa muodostuva **ON1**. Valmis SNA ja ylimääräinen **ON4** eluoutuivat HPLC:stä ulos samaan aikaan. **ON4**:n retentioaikaa muutettiin lisäämällä reaktioseokseen 2-(2-atsidoetoksi)etoksi-etikkahappoa (AEEA), jonka annettiin reagoida 16 h (kaavio 9). Valmiit reaktiot puhdistettiin RP-HPLC:llä. Tuotteen **16** eristetyksi saannoksi määritettiin 59 % TEAA-puskurissa ja 51 % natriumfosfaattipuskurissa olettaen 12-kertainen substituutio.

**Kaavio 9.** Oligonukleotidin **ON4** reaktio AEEA:n kanssa retentioajan siirtämistä varten

Kaikissa reaktio-olosuhteissa havaittiin *N*-metoksioksatsolidiinilinkkerin hajoamista. TEAA-puskurissa sitä havaittiin kaikista eniten. Natriumfosfaattipuskurissa hajoamista havaittiin huomattavasti vähemmän. DMSO:ssa tehty reaktio näytti vielä paremmalta, ja kuivassa pyridiinissä sekä pyridiini/DMSO-seoksessa tehdyissä reaktioissa hajoamista havaittiin vielä vähemmän. Reaktioliuosten HPLC-profiilit on esitetty kuvassa 5 ja geelielektroforeesit kuvassa 6. Linkkerin hajoamisen takia SNA:n todellinen substituutioaste ei ole varmaa.



Kuva 5. HPLC-kromatogrammit täyssubstituutioista. A) TEAA-puskuri 3 d, B) natriumfosfaattipuskuri 3 d, C) DMSO 2 d, D) kuiva pyridiini 6 d, E) Kuiva pyridiini/DMSO 6 d, F) Kuiva DMSO 6 d



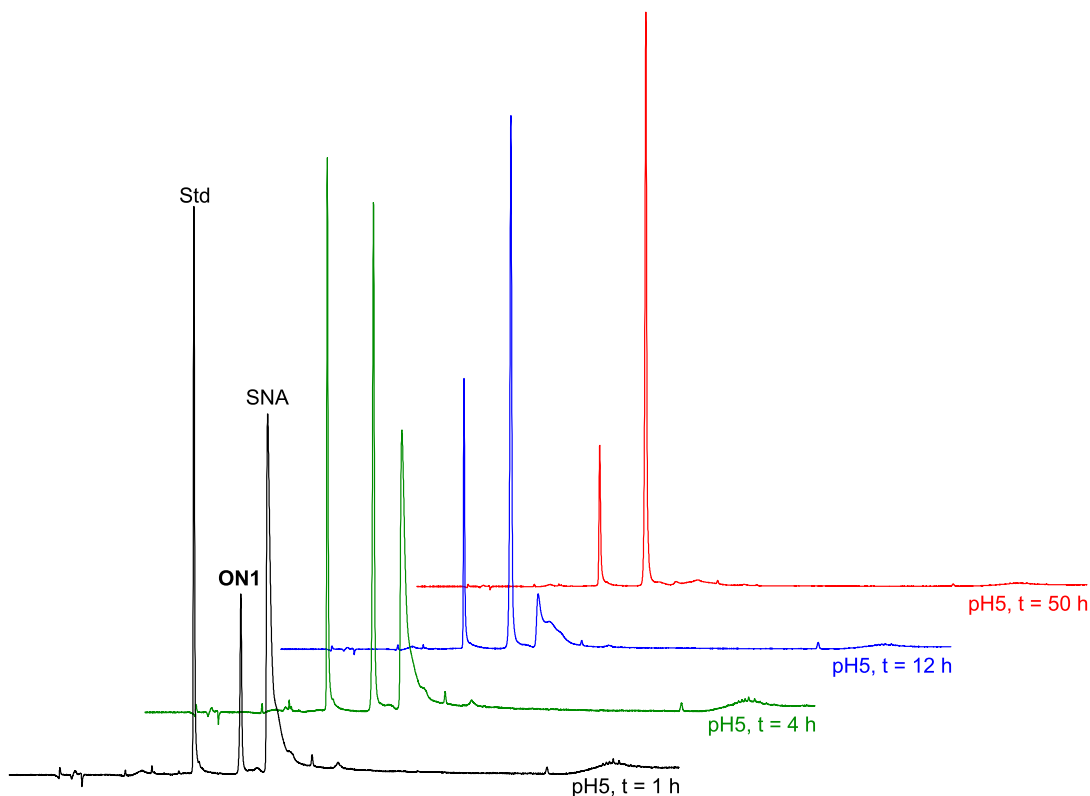
Kuva 6. Geelielektroforeesianalyysit SNA-rakenteille. Synteesiliuotin ja reaktioaika: A) natriumfosfaattipuskuri 3 d, B) DMSO 3d, C) kuiva pyridiini 3 d, D) kuiva pyridiini/DMSO 3d, E) kuiva DMSO 3 d, F) kuiva pyridiini 6 d, G) kuiva pyridiini/DMSO 6 d, H) kuiva DMSO 6 d. A on puhdistettu SNA-rakenne, ja se on analysoitu samalla geelillä B:n kanssa. Muut ovat puhdistamattomista reaktioseoksista. C-H on analysoitu samalla geelillä. Merkitsemättömät pystyrivit ovat analyyseissä käytetyt referenssinäytteet.

Kaikissa geelielektroforeesianalyyseissä havaittiin SNA:n kohdalla vähintään kolme täplää. Reaktio-olosuhteista riippuen täplien suhteelliset intensiteetit vaihtelivat. Esimerkiksi pyridiiniä sisältävissä reaktioissa kolmesta täplästä kaikkein alin oli hyvin himmeä ja ylin kaikista intensiivisin, kun taas natriumfosfaattipuskurissa tehdyssä SNA:ssa keskimäinen täplä on kaikista voimakkain. Oletuksena on, että ylimääräiset täplät johtuvat SNA-rakenteista, joissa osa *N*-metoksioksatsolidiinilinkeristä on hajonnut. Tämä täytyy kuitenkin jotenkin saada varmistettua. Reaktio-olosuhteiden ja reaktioajan suhteen voisi olla mahdollista tehdä vielä lisää optimointia. Esimerkiksi pyridiiniä sisältävien reaktioseoksien tapauksessa kolmannen täplän havaittiin voimistuvan reaktioajan pidentyessä, ja hajonnutta linkkeriä havaittiin enemmän (vertaa C ja F sekä D ja G kuvassa 6). Toisaalta liian lyhyellä reaktioajalla C60-fullereenikeskusrakenteen substituutio ei ehdi loppuun.

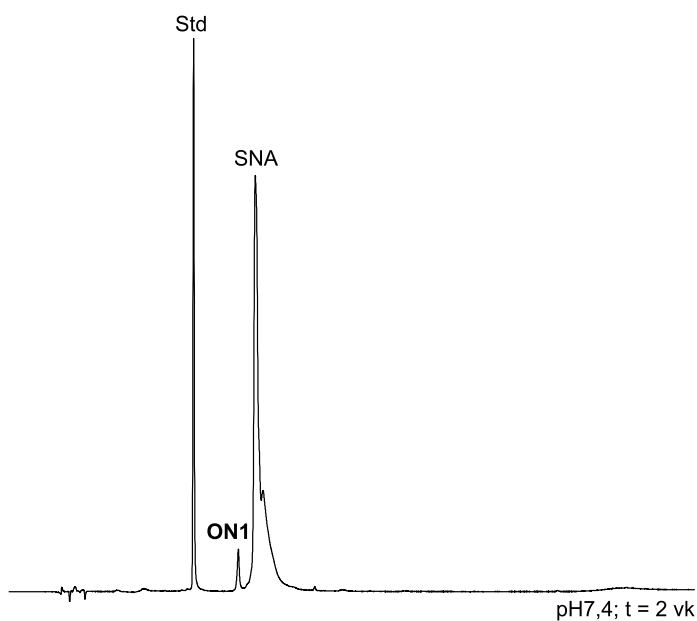
2.2.3 SNA-rakenteen hydrolyysin kinetiikka

SNA-rakenteen (**16**) hydrolyysin nopeutta tutkittiin kolmessa eri pH:ssa (pH=5; pH=6 ja pH=7,4) 37 °C:ssa. Kinetiikkamittaukset tehtiin natriumfosfaattipuskurissa valmistetulla SNA-rakenteella (**16**). SNA:n konsentraatio reaktioliuoksissa oli 0,38 μM . Sisäisenä standardina käytettiin retentioajaltaan reaktiokomponenteista hyvin erottuvaa oligonukleotidia (CTC CAT GGT GCT CAC).^{3,128}. Reaktioissa seurattiin *N*-metoksioksatsolidiinilinkerin hajotessa muodostuvan ISE- U^{NOMe} -oligonukleotidin (**ON1**) muodostumista (kaavio 10). Kromatogrammin piikit integroitiin, ja ISE- U^{NOMe} :n

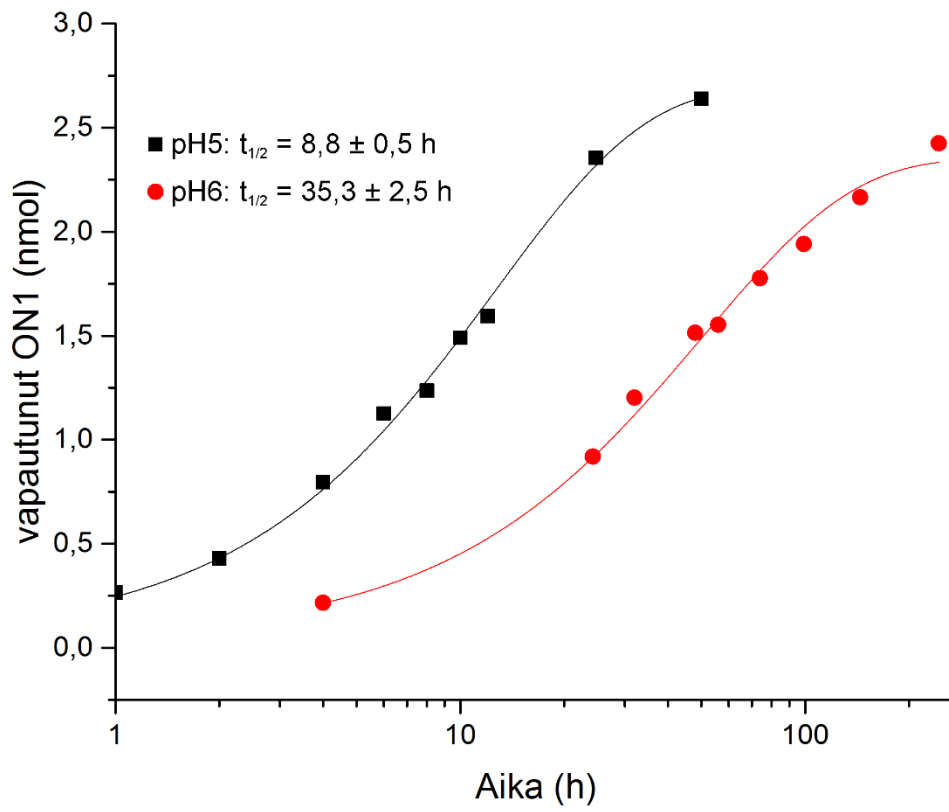
määrä kvantitoitiin vertaamalla sen pinta-alaa sisäisen standardin pinta-alaan. SNA:n hydrolyysin puoliintumisajat määritettiin pH:ssa 5 ($t_{1/2} = 8,8 \pm 0,5$ h) ja pH:ssa 6 ($t_{1/2} = 35,3 \pm 2,5$ h) ensimmäisen kertaluvun nopeuslain mukaisesti (kuva 8). pH:ssa 5 SNA-rakenne hajosi lähes kokonaan kahdessa viikossa, ja se hajosi nopeasti myös pH:ssa 6. Fysiologisessa pH:ssa 7,4 SNA osoittautui hyvin pysyväksi, eikä se juurikaan hajonnut kahdessa viikossa (HPLC-kromatogrammi on esitetty kuvassa 7).



Kaavio 10. Valikoidut kromatogrammit pH5-kinetiikkamittauksista ajanhetkiltä 1 h, 4 h, 12 h ja 50 h.

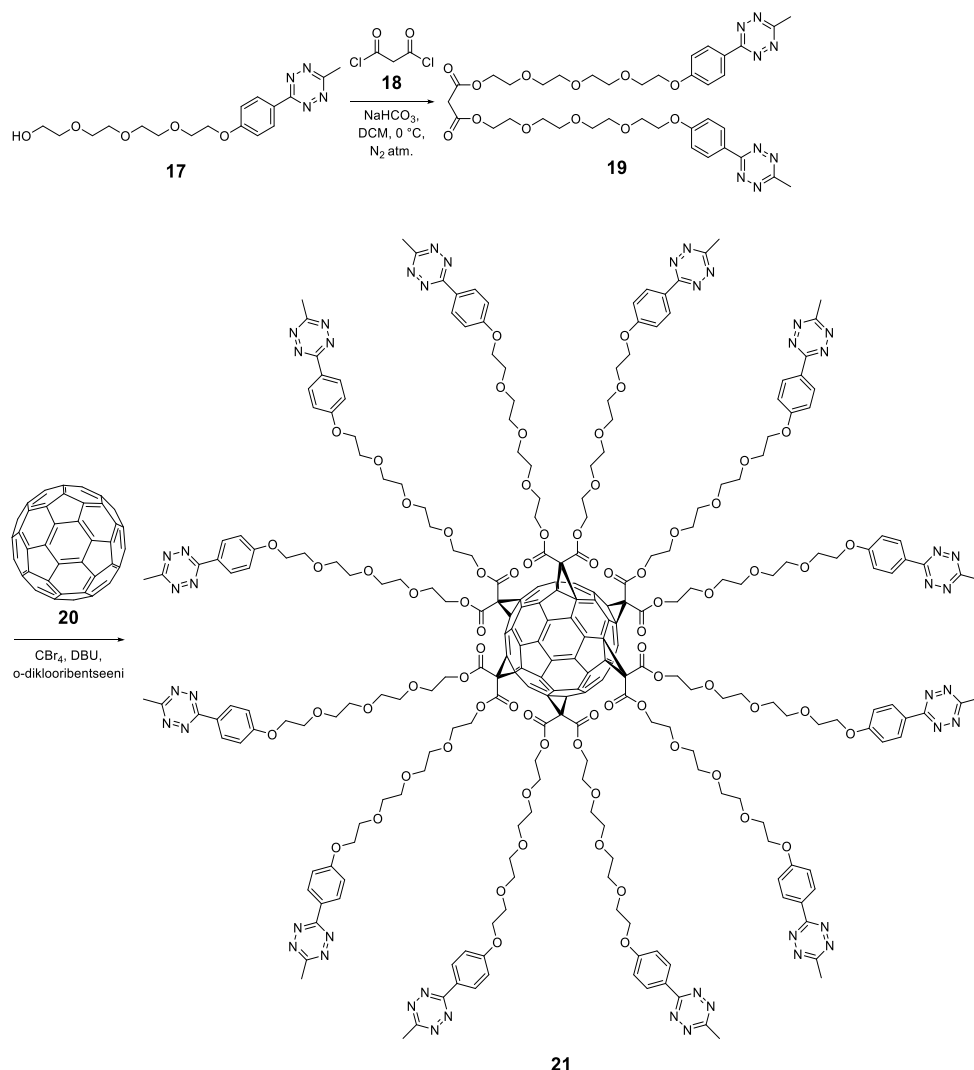


Kuva 7. Kromatogrammi SNA:sta, joka on ollut pH:ssa 7,4 kaksi viikkoa. Rakenne on hajonnut hyvin vähän.



Kuva 8. pH5 ja pH6 kinetiikkareaktioissa vapautuneen oligonukleotidin määrä ajan funktiona.

2.3 Tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne



Kaavio 11. Tetratsiinifunktionalisoidun C60-fullereenikeskusrakenteen (21) synteysi

Pitkien reaktioaikojen vuoksi atsidifunktionalisoidulla C60-fullereenikeskusrakenteella (14) havaittiin suhteellisen paljon *N*-metoksioksatsolidiinilinkkerin katkeamista. Tämän vuoksi päätettiin valmistaa uusi fullereenikeskusrakenne (21), jonka konjugaatiokemia perustuu tetratsiinin ja *trans*-syklo-okteenin väliseen *inverse electron demand* Diels–Alder-reaktioon (IEDDA) SPAAC-kemian sijaan. IEDDA-reaktio ($k_2 = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹²⁹ on huomattavasti nopeampi kuin SPAAC-reaktio ($k_2 \leq 2,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{130–132}.

Keskusrakenne syntetisoitiin aiemmin julkaistua protokollaa soveltaen.⁴² TEG-tetratsiinista (17) tehtiin malonaatti reaktiolla malonyylikloridin (18) kanssa. TEG-tetratsiinimalonaatista (19) yritettiin tehdä tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne (21) Bingelin syklopropanaatiolla (kaavio 11), mutta reaktio ei onnistunut. Silikageelikromatografisesta puhdistuksesta kerätyt fraktiot puhdistettiin RP-HPLC:llä. Fraktiot analysoitiin massaspektrometrillä ja niiden havaittiin olevan

brominoituneita TEG-tetratsiinimalonaatteja, jotka eivät olleet reagoineet C60-fullereenin (**20**) kanssa. Haluttua tuotetta ei havaittu.

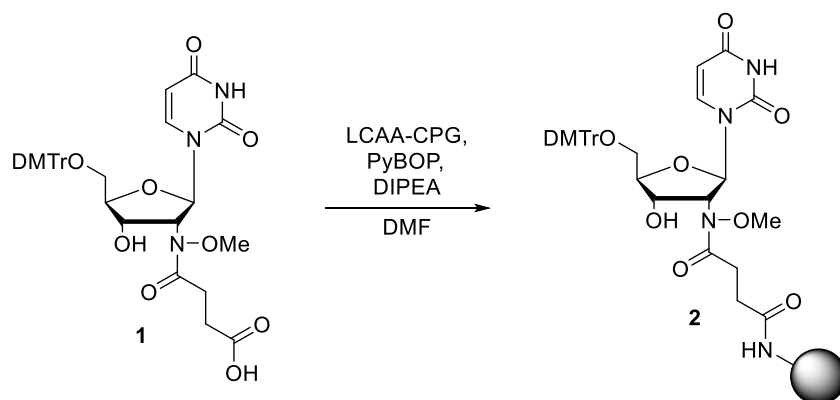
3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Massaspektrit mitattiin Bruker micrO-TOF-Q -massaspektrometrillä ellei toisin mainita. HPLC-puhdistuksissa ja -analyyseissä käytettiin Clarity Oligo-RP (250 × 10,0 mm, 5 μm) semipreparatiivista kolonna ja 260 nm detektioaallonpituutta ellei toisin mainita. Oligonukleotidien ja pallonukleiinihappojen saannot määritettiin UV-spektrofotometrisesti aallonpituudella 260 nm. Geelielektroforeesissa käytettiin Novex 6 % TBE geelejä, ja ajon aikana käytettiin 200 V jännitettä ja 45 mA virtaa.

3.2 Oligonukleotidien synteesi

3.2.1 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan



Kaavio 12. 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin immobilisointi kiinteään kantajaan

Kiinteä kantaja **2** syntetisoitiin aiemmin julkaistua protokollaa³² mukailleen. LCAA-CPG-kantajan (2,5 g) joukkoon lisättiin DMF:iin (3,3 ml) liuotettu 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinisukkinaatti (**1**) (0,34 g). Joukkoon lisättiin DMF:ia kunnes kantaja oli kokonaan liuottimen alla. Suspensioon lisättiin DMF:iin (400 μl) liuotettu PyBOP (0,29 g) ja DIPEA (173 μl). Reaktiota ravisteltiin 72 h, jonka jälkeen kantaja **2** suodatettiin ja pestiin DMF:lla sekä dikloorimetaanilla (DCM). Kuivuneen kantajan reagoimattomat amino- ja hydroksiryhmät asetyloitiin etikkahappoanhydridin, lutidiinin, 1-metyyli-imidatsolin ja THF:in seoksella (5:5:8:82, v:v:v:v). Asetylointikäsitely kesti 10 min ja se toistettiin kaksi kertaa. Asetyloitu kantaja suodatettiin, ja sitä pestiin DMF:lla ja DCM:lla. Pesty kantaja kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Kantajaan sitoutuneen 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin määrä määritettiin aikaisemmin julkaistua protokollaa mukailleen.¹³³ Pieni määrä kantajaa **2** (20 mg) lisättiin 3 %

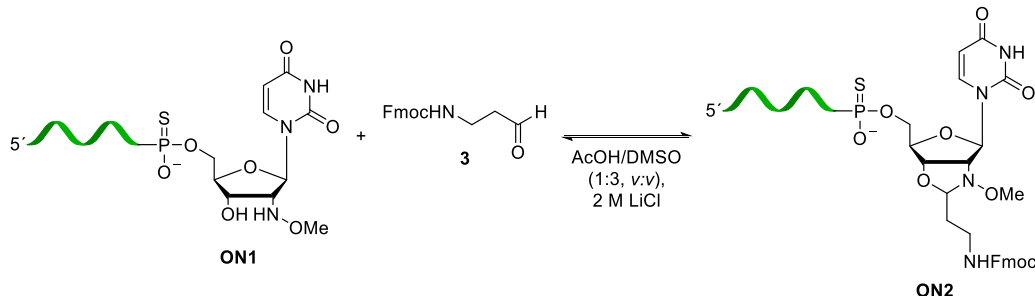
dikloorietikkahappo/dikloorimetaaniliuokseen (50 ml). Irronneen DMTr-kationin ainemääräksi määritettiin 0,62 μmol UV/VIS-spektrofotometrisesti aallonpituudella 504 nm ($\epsilon_{504} = 76 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$)¹³³. Kantajaan **2** sitoutuneen 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksi-amino)uridiinin määrä ($L = \text{loading} = 0,62 \mu\text{mol}/20 \text{ mg} = 31 \mu\text{mol/g}$) määritettiin vapautuneen DMTr-kationin määrästä.

3.2.2 Oligonukleotidin ISE-U^{NOMe} synteesi

Oligonukleotidi ISE-U^{NOMe} (**ON1**) (5 μmol) syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla 1 μmol skaalalla kaupallisista fosforamidiittirakenneyksiköistä käyttäen kiinteää kantajaa **2**. Kytkennoissä käytettiin 300 s kytkentäaika, ja aktivaattorina käytettiin 0,3 M bentsyyliitetratsolia. Sulfurisaatio tehtiin 0,1 M 3-fenyyl-1,2,4-ditiatsoliini-5-onilla 150 s reaktioajalla. **ON1** irrotettiin kiinteältä kantajalta inkuboimalla sitä ammoniakkiin väkevässä vesiliuoksessa 55 °C:n lämpötilassa 16 h. Liuos haihdutettiin kuiviin, ja haihdutusäännös liuotettiin mQ-veteen. **ON1** puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH=7,0)). Saannoksi määritettiin 1,6 μmol (31 %).

ESI-MS: m/z 1621,0835 [$\text{M}-5\text{H}$]⁵⁻ (havaittu); 1621,0934 [$\text{M}-5\text{H}$]⁵⁻ (laskettu)

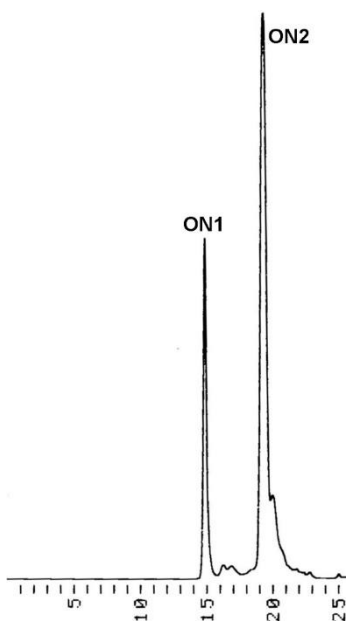
3.2.3 *N*-metoksioksatsolidiinin muodostus



Kaavio 13. Oligonukleotidin **ON2** synteesi

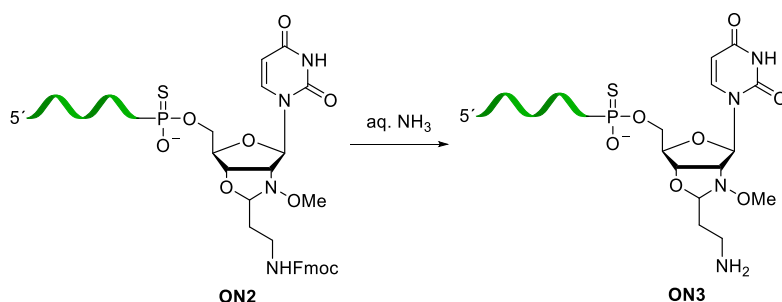
Oligonukleotidi **ON1** (1,6 μmol) siirrettiin mikrosentrifugiputkeen, jonne lisättiin asetonitriiliin liuotettu Fmoc-β-Ala-H (**3**) (160 μl ; 3,2 μmol ; 2,0 ekv.). Seos kylmäkuivattiin. Haihdutusjäännös liuotettiin AcOH/DMSO-seokseen (300 μl , 1:3, v:v), jossa oli myös 2 M LiCl. Liuosta inkuboitiin uunissa (55 °C), ja 1,5 h kuluttua reaktio pysäytettiin lisäämällä ACN/H₂O-seosta (800 μl , 1:4, v:v), jossa oli 1,0 M NaOH ja 0,2 M TEAA. Reaktio puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH=7,0)), ja fraktiot kylmäkuivattiin. Eristetyn tuotteen (**ON2**) saannoksi määritettiin 0,86 μmol (55 %). Massaspektrissä näkyi myös tuotetta, josta Fmoc-suojaryhmä on irronnut.

ESI-MS: m/z 1675,5685 [$\text{M}-5\text{H}$]⁵⁻ (havaittu); 1676,5580 [$\text{M}-5\text{H}$]⁵⁻ (laskettu)



Kuva 9. RP-HPLC-profiili *N*-metoksioksatsolidiin muodostumiselle

3.2.4 Fmoc-suojaryhmän irrottaminen oligonukleotidikonjugaatin aminopäästä

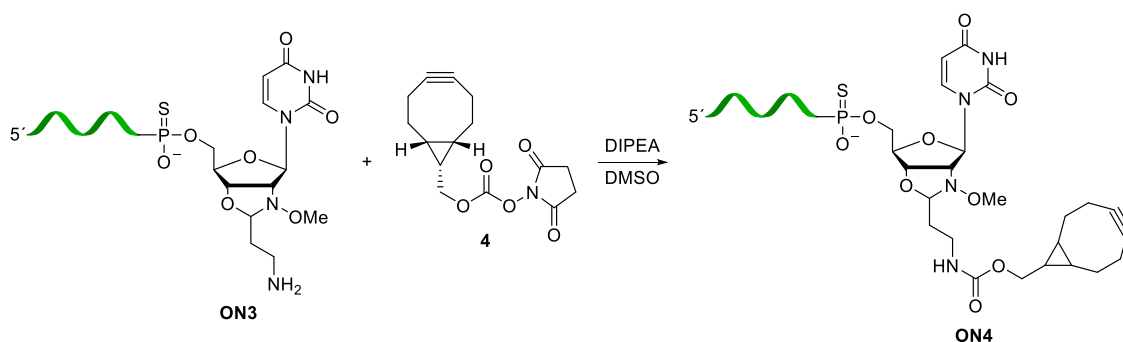


Kaavio 14. Oligonukleotidin ON3 synteesi

Oligonukleotidi **ON2** (0,86 μmol) liuotettiin ammoniakkin väkevään vesiliuokseen (700 μl). Liuosta inkuboitiin huoneenlämmössä 4 h. Reaktioliuosta uutettiin dikloorimetaanilla (3 \times 300 μl). Vesifaasi pipetoitiin talteen orgaanisen faasin päältä. Oligonukleotidi **ON3** jäi vesifaasiin, joka kylmäkuivattiin. Saantoa ei määritetty.

ESI-MS: m/z 1632,1499 $[\text{M}-5\text{H}]^{5-}$ (havaittu); 1632,1094 $[\text{M}-5\text{H}]^{5-}$ (laskettu)

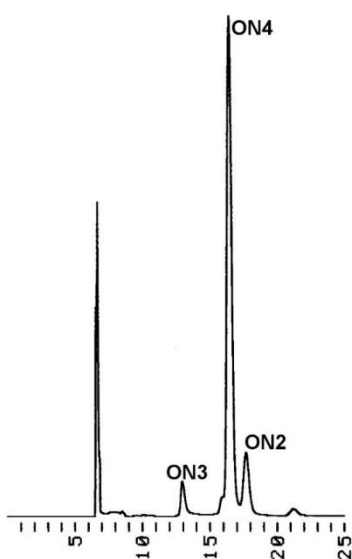
3.2.5 Syklo-oktyynin liittäminen oligonukleotidikonjugaattiin



Kaavio 15. Oligonukleotidin ON4 synteesi

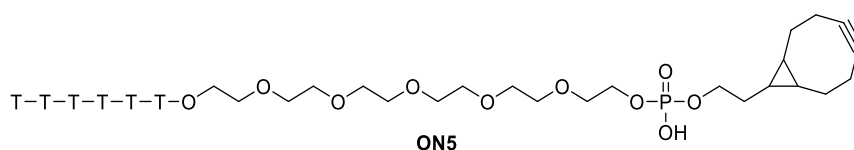
(1*R*, 8*S*, 9*s*)-bisyklo[6.1.0]non-4-yn-9-yyli)metyyli-*N*-sukkinimidyyl-karbonaatista (**4**) ja DIPEA:sta valmistettiin kantaliuokset. Yhdiste **4** (5,5 mg; 19 μmol) liuotettiin DMSO:iin (94 μl), ja DIPEA (17 μl; 98 μmol) liuotettiin DMSO:iin (480 μl). Kylmäkuivatun oligonukleotidin **ON3** (0,86 μmol) joukkoon lisättiin yhdisteen **4** kantaliuosta (11 μl; 2,2 μmol), DIPEA:n kantaliuosta (13 μl; 2,6 μmol) ja DMSO:ia (6,4 μl). Reaktiota seurattiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH=7,0)). 2 h jälkeen reaktioseokseen lisättiin yhdisteen **4** kantaliuosta (43 μl; 8,7 μmol) ja DIPEA:n kantaliuosta (45 μl; 9,2 μmol). Reaktion annettiin edetä vielä 2 h, jonka jälkeen se puhdistettiin HPLC:llä. Kerätyt fraktiot kylmäkuivattiin. Eristetyn tuotteen (**ON4**) saannoksi määritettiin 0,52 μmol (61 %).

ESI-MS: m/z 1667,1977 $[M-5H]^{5-}$ (havaittu); 1667,3524 $[M-5H]^{5-}$ (laskettu)



Kuva 10. RP-HPLC-profiili syklo-oktyynin liittämiseksi oligonukleotidikonjugaattiin

3.2.6 5'-syklo-oktyyni-HEG-T6-oligonukleotidi



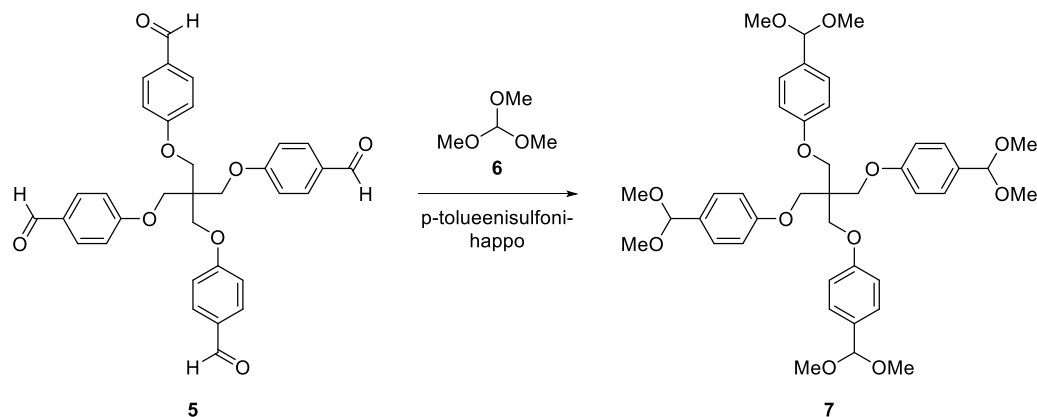
Kuva 11. 5'-syklo-oktyyni-HEG-T6 oligonukleotidi

5'-syklo-oktyyni-HEG-T6-oligonukleotidi (**ON5**) valmistettiin Applied Biosystems 3400 DNA-syntetisaattorilla 1 μmol:n skaalalla. **ON5** irrotettiin kiinteältä kantajalta inkuboimalla sitä ammoniakkin väkevässä vesiliuoksessa 55 °C:n lämpötilassa 16 h. Liuos haihdutettiin kuiviin, ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen. **ON5** puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, TEAA-puskuri (100 mM; pH=7,0), 260 nm, Thermo ODS Hypersil C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)). Tuotteen saannoksi määritettiin 0,53 μmol (53 %).

ESI-MS: m/z 1165,2495 $[M-2H]^{2-}$ (havaittu); 1165,2522 $[M-2H]^{2-}$ (laskettu)

3.3 PET-keskusrakenne

3.3.1 4,4'-((2,2-bis((4-(dimetoksimetyyli)fenoksi)metyyli)propani-1,3-diyyli)bis(oksi))bis((dimetoksimetyyli)bentseeni) (7)



Kaavio 16. Yhdisteen 7 synteesi

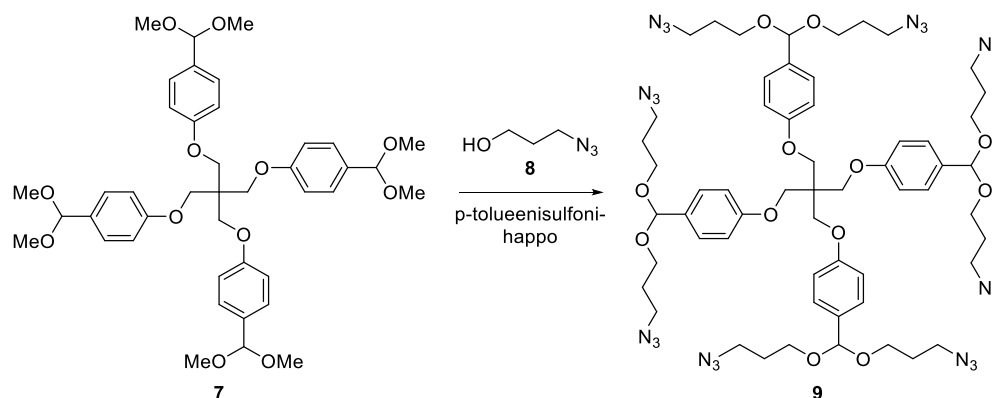
Yhdiste **5** (0,55 g; 1,0 mmol), trimetyyliortoformaatti (**6**) (20 ml) ja p-tolueenisulfonihappo (31 mg) lisättiin keittopulloon. Keittopullo varustettiin pystyjäähdyttimellä ja kalsiumkloridiputkella. Reaktioseosta lämmitettiin öljyhauteella (60 °C), jolloin kaikki kiinteä aine liukeni. Öljyhaute poistettiin, ja reaktio jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön 16 h. Reaktio todettiin valmiiksi TLC:llä, ja se pysäytettiin lisäämällä joukkoon 3,0 ml trietyyliamiinia. Reaktioseokseen lisättiin 60 ml dikloorimetaania, ja sitä pestiin kylläisellä NaHCO_3 :lla (2 \times 60 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina DCM/MeOH (98:2, v:v). Tuotteen **7** Saannoksi määritettiin 0,73 g (99 %).

ESI⁺-MS: m/z 775,3062 $[M+K]^+$ (havaittu); 775,3090 $[M+K]^+$ (laskettu)

¹H-NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ = 7,36 (8H, d, J = 8,6 Hz, Ar); 6,93 (8H, d, 8,8 Hz, Ar); 5,36 (4H, s, H9); 4,38 (8H, s, H2); 3,32 (24H, s, H10)

¹³C-NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ = 158,9 (Ar); 130,8 (Ar); 127,9 (Ar); 114,3 (Ar); 102,9 (C9); 66,6 (C2); 52,5 (C10); 44,8 (C1)

3.3.2 4,4'-((2,2-bis((4-(bis(3-atsidopropoksi)metyyli)fenoksi)metyyli)propani-1,3-diyyli)bis(oksi))bis((bis(3-atsidopropoksi)metyyli)bentseeni) (9)



Kaavio 17. Yhdisteen 9 synteesi

Keittopullo kuivattiin liekittämällä ennen reaktiota. Reaktio tehtiin typpi-ilmakehässä. Yhdiste 7 (0,19 g; 0,26 mmol) punnittiin keittopulloon. Joukkoon lisättiin 3-atsido-1-propanoli (8) (2,1 g; 20,8 mmol), p-tolueenisulfonihappo (5,0 mg; 29 μ mol) ja muutama molekyyli-seula. Reaktioseosta sekoitettiin ultraäänihauteessa huoneenlämmössä 48 h. Reaktiota seurattiin HPLC:llä (80–100 % ACN 15 min, 100 % ACN 15–25 min, 260 nm). Tuotepiikin havaittiin olevan pienempi kuin sivutuotepiikin, ja reaktion tasapainoa yritettiin siirtää haihduttamalla reaktioseosta pyöröhaiduttimella. Tämän havaittiin toimineen, ja reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä 9 d jälkeen.

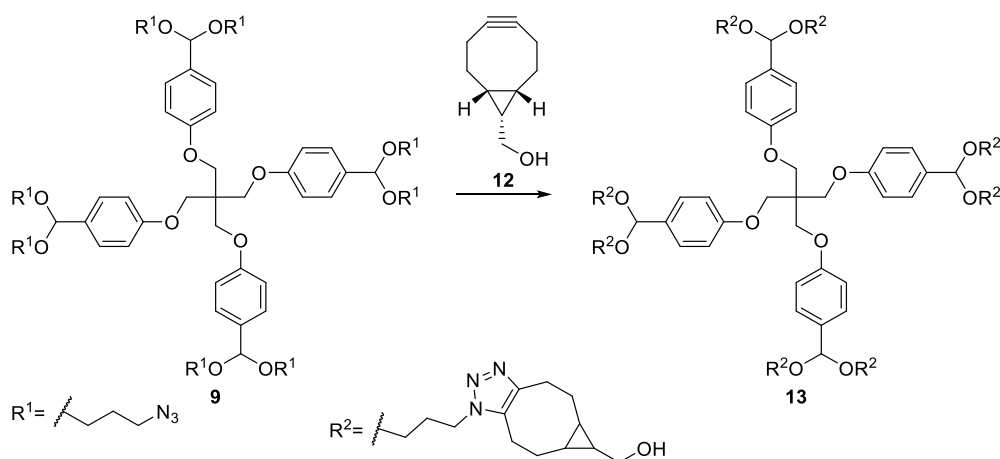
ESI⁺-MS: m/z 1311,5938 [M+Na]⁺; 1311,5967 [M+Na]⁺ (laskettu)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7,33 (8H, d, J = 8,7 Hz, Ar); 6,91 (8H, d, J = 8,8 Hz, Ar); 5,45 (4H, s, H9); 4,35 (8H, s, H2); 3,62–3,46 (16H, m, H10); 3,40 (16H; t, J = 6,7 Hz, H12); 1,85 (16H, quint, J = 6,3 Hz, H11)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 159,0 (Ar); 131,0 (Ar); 127,8 (Ar); 114,4 (Ar); 101,6 (C9); 66,5 (C2); 62,0 (C10); 48,5 (C12); 44,7 (C1); 29,1 (C11)

Veteen liuotettu oligonukleotidi **ON5** (27 μ l; 71 nmol; 12 ekv.) ja DMSO:iin liuotettu **9** (3,0 μ l; 6 nmol) pipetoitiin mikrosentrifugiputkeen. Joukkoon lisättiin heksyyliamiini (5,0 μ l) ja DMSO (20 μ l). Reaktio annettiin olla tasoravistelijassa huoneenlämmössä 7 d. Reaktio puhdistettiin HPLC:llä (5–45 % ACN 30 min, TEAA-puskuri (100 mM; pH=7,0), 260 nm, Thermo ODS Hypersil C18 (250 \times 4,6 mm, 5 μ m)). Kerätyt fraktiot analysoitiin massaspektrometrillä ilman kylmäkuivausta. Tuotetta ei havaittu.

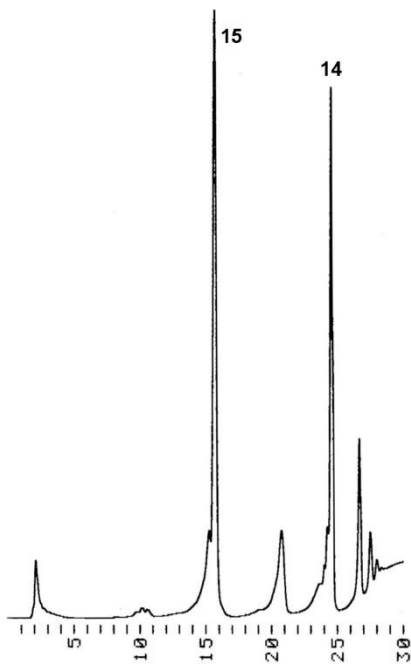
3.3.5 PET-keskusrakenteen täyssubstituutio pienmolekyyleillä



Kaavio 20. PET-keskusrakenteen täyssubstituutio yhdisteellä **12**

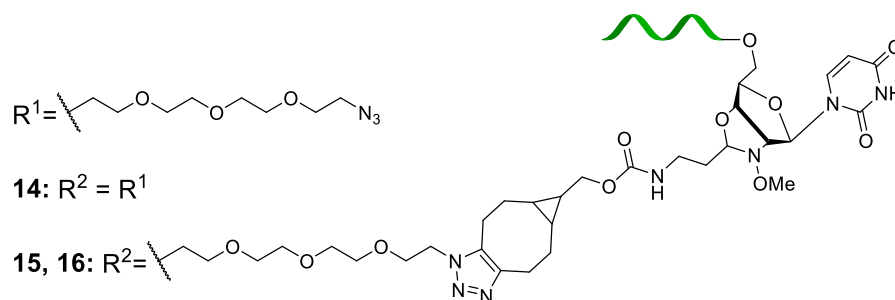
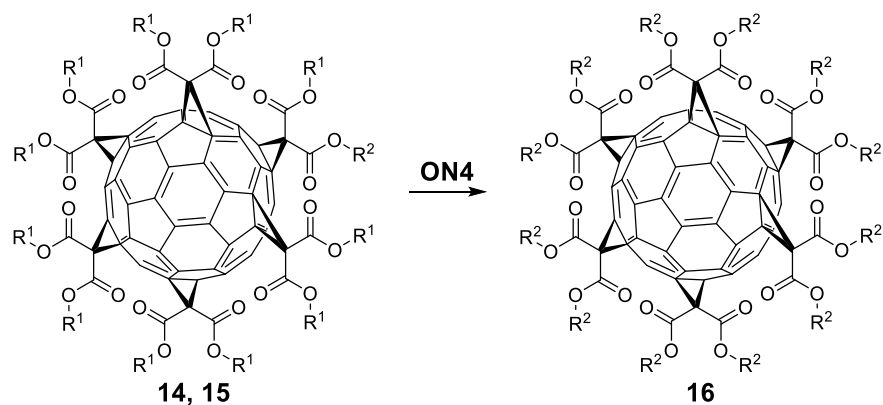
Mikrosentrifugiputkeen pipetoitiin DMSO:iin liuotettu **9** (50 μ l; 100 nmol) ja DMSO:iin liuotettu (1*R*,8*S*,9*s*)-Bisyklo[6.1.0]-non-4-yn-9-yyliimetaanoli (**12**) (200 μ l; 2000 nmol; 20 ekv.). Reaktio jätettiin huoneenlämpöön 16 h. Reaktio puhdistettiin HPLC:llä (5–100 % ACN 30 min, TEAA-puskuri (100 mM; pH=7,0), 260 nm, Thermo ODS Hypersil C18 (250 \times 4,6 mm, 5 μ m)). Kerätyt fraktiot kylmäkuivattiin ja analysoitiin massaspektrometrillä.

ESI⁺-MS: m/z 1245,6869 $[M+2H]^{2+}$ (havaittu), 1245,7294 $[M+2H]^{2+}$ (laskettu)



Kuva 12. RP-HPLC-profiili monosubstituutiolle

3.4.2 C60-fullereenikeskusrakenteen täyssubstituutio



Kaavio 22. C60-fullereenikeskusrakenteisen SNA-rakenteen synteesi

Reaktio-olosuhteet on esitetty taulukossa 3. Synteeseissä käytetyt reagenssit (**ON4** ja **14** tai **15**) pipetoitiin mikrosentrifugiputkeen ja kylmäkuivattiin. Ennen kylmäkuivausta **ON4** ja monosubstituutiotuote **15** olivat liuotettuina TEAA-puskuriin (100 mM; pH=7,6) ja C60-fullereenikeskusrakenne (**14**) oli liuotettuna DMSO:iin. Haihdutusjännös liuotettiin taulukossa 3 mainittuun liuottimeen. Kuivien olosuhteiden reaktioita varten

haihdutusjäännös kuivattiin vakuumeiksikkaattorissa, LiCl kuivattiin uunissa (130 °C, 3 d) ja DMSO sekä pyridiini kuivattiin molekyyliseuloilla. Reaktioiden annettiin olla huoneenlämmössä, ja niistä otettiin näytteitä, jotka analysoitiin HPLC:llä (5–60 % ACN 40 min, TEAA-puskuri (50 mM; pH=7,0), 260 nm, Aeris WIDEPORÉ XB-C18 (150 × 4,6 mm, 3,6 µm)). SNA ja reagoimaton oligonukleotidi **ON4** tulivat päällekkäin HPLC-analyyseissä. Oligonukleotidin retentioaikaa muutettiin lisäämällä näytteeseen 60 ekv. DMSO:iin liuotettua (2-(2-atsidoetoksi)etoksi)etikkahappoa (AEEA), joka reagoi oligonukleotidin kanssa. AEEA:n lisäyksen jälkeen reaktion annettiin edetä vielä 16 h ennen HPLC-analyysiä. TEAA- ja fosfaattipuskureissa tehdyt SNA-rakenteet (**16**) puhdistettiin. Saannoiksi määritettiin UV-spektrofotometrisesti (olettaen 12-kertainen substituutio) 2,9 nmol (58 %) TEAA-puskurissa ja 1,1 nmol (51 %) fosfaattipuskurissa.

3.5 Kinetiikkamittaukset C60-fullereenikeskusrakenteisella SNA-rakenteella

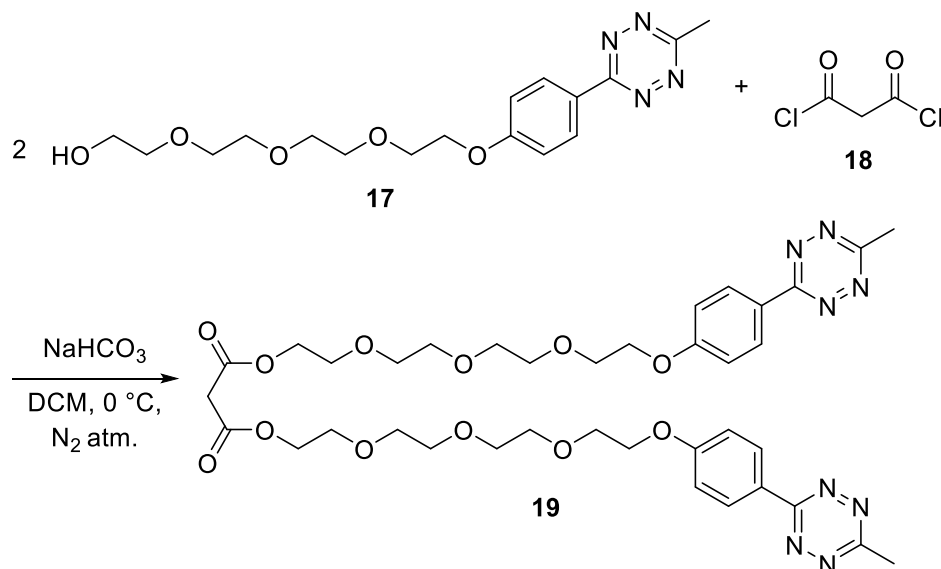
Kinetiikkamittaukset tehtiin fosfaattipuskurissa valmistetulla SNA:lla (**16**). Mittauksissa käytetyt puskurit (AcOH (pH5), MES (pH6) ja HEPES (pH7,4)) olivat 0,1 M vesiliuoksia, joiden ionivahvuus oli säädetty arvoon 0,1 M natriumkloridilla. Kinetiikkamittauksissa käytettiin sisäisenä standardina retentioajaltaan reaktiokomponenteista hyvin erottuvaa oligonukleotidia CTC CAT GGT GCT CAC (DNA).

pH5- ja pH6-kinetiikkamittauksia varten mikrosentrifugiputkeen pipetoitiin TEAA-puskuriin (100 mM, pH=7,6) liuotettu SNA (27 µl; 0,30 nmol) ja veteen liuotettu sisäinen standardi (2,7 µl; 1,0 nmol). Liuos kylmäkuivattiin. Toinen haihdutusjäännöksistä liuotettiin AcOH-puskuriin (780 µl; pH=5) ja toinen MES-puskuriin (780 µl; pH=6). pH7,4-kinetiikkaa varten mikrosentrifugiputkeen pipetoitiin TEAA-puskuriin (100 mM, pH=7,6) liuotettu SNA (8,2 µl; 0,09 nmol) ja veteen liuotettu sisäinen standardi (0,8 µl; 0,31 nmol). Liuos kylmäkuivattiin. Haihdutusjäännös liuotettiin HEPES-puskuriin (234 µl; pH=7,4). Reaktioluokset olivat 0,38 µM SNA:n suhteen. Liuoksia inkuboitiin vesihauteessa (37,0 ± 0,1 °C), ja niistä otettiin näytteitä (78 µl) sopivin väliajoin. pH5-reaktiosta otetut näytteet neutraloitiin 0,5 M NaOH:lla (3 µl) ja pH6-reaktioista otetut näytteet 0,2 M NaOH:lla (1 µl). Neutraloidut näytteet analysoitiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, TEAA-puskuri vedessä (50 mM; pH=7,0), 260 nm, Thermo ODS Hypersil C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)). SNA-rakenteesta vapautuneen oligonukleotidin määrä tietyllä ajanhetkellä kvantitoitiin piikkien pinta-alojen perusteella kaavan 1 mukaisesti. Puoliintumisajat määritettiin ensimmäisen kertaluvun nopeuslain mukaisesti.

$$(1) \quad n(ISE) = \frac{\epsilon(Standardi)}{\epsilon(ISE)} \cdot \frac{A(ISE)}{A(Standardi)} \cdot n(Standardi)$$

3.6 Tetratsiinifunktionalisoidun C60-fullereenikeskusrakenteen synteesi

3.6.1 bis(2-(2-(2-(2-(4-(6-metyyli-1,2,4,5-tetratsin-3-yyli)fenoksi)etoksi)etoksi)etoksi)etyyli)-malonaatti (19)



Kaavio 23. TEG-tetratsiinimalonaatin (**19**) synteesi

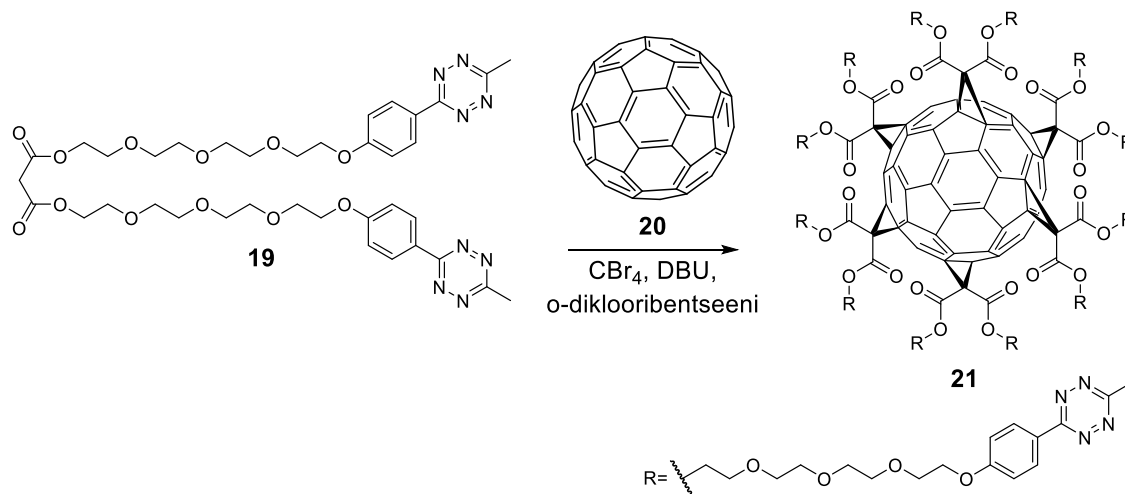
TEG-tetratsiini (**17**) (140 mg; 0,38 mmol; 2,2 ekv.) ja NaHCO₃ (110 mg; 1,3 mmol; 7 ekv.) liuotettiin kuivaan DCM:iin (7,2 ml) typpi-ilmakehässä. Liuos jäädytettiin 0 °C:een jäävesihauteella. Liuokseen lisättiin malonyylikloridia (**18**) (18 µl; 0,19 mmol) tipoittain. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 16 h. Reaktio tarkistettiin TLC:llä, jonka perusteella reaktion todettiin olevan vielä kesken. Liuos jäähdytettiin takaisin 0 °C:een, ja sinne lisättiin vielä 5,3 µl malonyylikloridia edelleen typpi-ilmakehässä. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 2,5 h, jonka jälkeen reaktion todettiin olevan valmis TLC:llä. Reaktioluokseen lisättiin 100 ml DCM:ia, ja sitä pestiin kylläisellä NaHCO₃:lla (3×30 ml) ja kylläisellä NaCl:lla (1×30 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote **19** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluentina trietyyliamiini/etyyliasettaatti (1:99, v:v). Tuote oli punainen öljymäinen neste. Saannoksi määritettiin 95 mg (60 %).

ESI⁺-MS: *m/z* 835,2680 [M+K]⁺ (havaittu); 835,3023 [M+K]⁺ (laskettu)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8,49 (4H, d, *J* = 8,9 Hz, Ar); 7,07 (4H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar); 4,28 (4H, t, *J* = 4,8 Hz, H3); 4,23 (4H, t, *J* = 4,8 Hz, H10); 3,89 (4H, t, *J* = 4,8 Hz, H9); 3,61–3,75 (20H, m, H4-H8); 3,42 (2H, s, H1); 3,03 (6H, s, H19)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 166,6$ (C18); 166,4 (C2); 163,7 (Ar); 162,5 (Ar); 129,6 (Ar); 124,3 (C17); 115,3 (Ar); 70,9 (C8); 70,7 (C7); 70,6 (C5&C6); 69,6 (C9); 68,8 (C4); 67,7 (C10); 64,5 (C3); 41,2 (C1); 21,0 (C3)

3.6.2 Tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne (21)



Kaavio 24. Tetratsiinifunktionalisoidun C60-fullereenikeskusrakenteen (**21**) synteysi

Kuivasta *o*-diklooribentseenistä ja DBU:sta poistettiin niihin liuennut happi kuplittamalla argonia niiden läpi. TEG-tetratsiinimalonaatti (**19**) (95 mg; 0,12 mmol; 10 ekv.) liuotettiin 2 ml:aan *o*-diklooribentseeniä argonilmakehässä. Liuokseen lisättiin C60-fullereeni (**20**) (8,7 mg; 12 μmol) ja 1,5 ml *o*-diklooribentseeniä. Joukkoon lisättiin vielä CBr_4 (400 mg; 1,2 mmol; 100 ekv.) ja viimeisenä DBU (36 μl ; 0,24 mmol; 20 ekv.). Reaktio suojattiin valolta ja sen annettiin olla huoneenlämmössä 72 h. Reaktioseos puhdistettiin silikageelikromatografisesti (MeOH/DCM; gradientilla 0:100–1,5:98,5; *v*:*v*). Tuote ei juurikaan puhdistunut. Raakatuote puhdistettiin HPLC:llä (40–100 % ACN 30 min, 260 nm, Aeris WIDEPORÉ XB-C8 (150 \times 4,6 mm, 3,6 μm)). Kerätyt fraktiot kylmäkuivattiin ja analysoitiin ThermoFisher Scientific Q Exactive -hybridikvadrupoli-Orbitrap-massaspektrometrillä. Fraktioiden havaittiin olevan brominoituneita malonaatteja.

ESI⁺-MS: m/z 875,2568 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (havaittu), 875,2575 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (laskettu)

4. Johtopäätökset ja yhteenveto

PET-keskusrakenne osoittautui melko labiiliksi rakenteeksi. Kun keskusrakenteen substituutiota yritettiin oligonukleotideilla, tuotteita ei saatu eristettyä, vaan tuotteet hajosivat kylmäkuivauksen ja puhdistuksen aikana. Pienmolekyyleillä tehdyssä substituutiassa tuote sen sijaan saatiin eristettyä. Tämä viittaisi siihen, että keskusrakenteen hajoaminen liittyy jotenkin oligonukleotideihin, mahdollisesti niiden happamiin fosforihapporyhmiin. Jos näin on, niin keskusrakennetta voisi silti

mahdollisesti käyttää esimerkiksi PNA-rakenteiden kanssa. Lisäksi keskusrakenteen stabiilisuutta pystyy mahdollisesti parantamaan muuttamalla linkkerien rakennetta ja pituutta.

C60-fullereenikeskusrakenne oli huomattavasti parempi kuin PET-keskusrakenne, vaikka sekään ei ollut täysin ongelmaton. Oligonukleotidin **ON4** synteesi onnistui hyvin. *N*-metoksioksatsolidiiniligaatio onnistui hyvällä saannolla, ja Fmoc-suojaryhmän poisto konjugaatista sekä syklo-oktyynin liittäminen konjugaattiin onnistuivat HPLC-kromatogrammien perusteella lähes kvantitatiivisesti. Kokonaisuudessaan oligonukleotidisynteesin saannoksi saatiin 33,3 %.

Myös C60-fullereenikeskusrakenteen monosubstituutio onnistui hyvin. Täyssubstituution kanssa sen sijaan oli ongelmia, sillä *N*-metoksioksatsolidiinilinkkeri hajosi synteesin aikana. Synteesille kokeiltiin useita eri olosuhteita, mutta linkkerin hajoamisesta ei päästy kokonaan eroon. Pyridiinissä tehdyssä reaktiossa hajoamista tapahtui melko vähän. Toisaalta kyseisissä olosuhteissa SNA-piikin jälkeen kromatogrammissa tulee vielä jokin toinen pienempi piikki, mikä mahdollisesti viittaa siihen, että täyssubstituutio ei mene aivan loppuun pyridiinissä. Geelielektroforeesilla kaikissa reaktioissa havaittiin useampi kuin yksi täplä. Täpliä pitäisi olla vain yksi, jos SNA-rakenne on oikeasti homogeeninen. SNA-rakenteen täydellinen karakterisointi on toistaiseksi tekemättä, ja sen seurauksena myös SNA:n todellinen substituutioaste jäi määrittelemättä. Lopullinen tuote on todennäköisesti 11- ja 12-haaraisten SNA-rakenteiden seos.

Reaktio-olosuhteiden ja reaktioajan suhteen voisi vielä tehdä lisää optimointia, jolloin linkkerin hajoamista voisi tapahtua vielä vähemmän. Lisäksi linkkerien rakenteen variointi voisi tehdä rakenteesta pysyvämmän. Tietysti liian pysyvä linkkeri happolabiilissa rakenteessa ei ole toivottu, ja pysyvyyden sekä riittävän nopean hajoamisen välillä täytyy löytää kompromissi. Keskusrakenteen ja oligonukleotidin välisen linkkerin pidentäminen voi mahdollisesti lisätä rakenteen pysyvyyttä. Toinen vaihtoehto olisi *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiossa käytetyn aldehydin vaihtaminen esimerkiksi Fmoc-Gly-H-aldehydiin, jolla muodostetut konjugaatit ovat aikaisempien tuloksien mukaan pysyvämpiä.³³ Tetratsiinifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne voisi myös olla ratkaisu ongelmiin huomattavasti nopeamman reaktioajan takia. Keskusrakenteen synteesi kuitenkin epäonnistui tuntemattomasta syystä, ja aikarajoitusten takia synteesiä ei ehditty toistamaan. Atsidifunktionalisoitu C60-fullereenikeskusrakenne on kuitenkin syntetisoitu vastaavalla tavalla,⁴² joten synteesin pitäisi olla mahdollinen, koska rakenteiden välillä ei ole suurta eroa.

Kinetiikkamittaukset tehtiin natriumfosfaattipuskurissa valmistetulla SNA:lla, ja saadut tulokset ovat lupaavia. SNA-rakenne hajoaa nopeasti pH:ssa 5 ja 6, ja on hyvin pysyvä fysiologisessa pH:ssa 7,4. Verrattuna aikaisempiin biohajoaviin SNA-rakenteisiin^{78,110} tässä tutkimuksessa valmistettu SNA on huomattavasti stabiilimpi fysiologisessa pH:ssa. SNA-rakenteen puoliintumisajat ovat samaa luokkaa aikaisempien *N*-metoksioksatsolidiinilla muodostettujen oligonukleotidikonjugaattien puoliintumisaikojen kanssa^{32,33} sekä hydratsonilinkkerin sisältävien konjugaattien kanssa.^{126,127} Syklo-oktyynimodifikaation ansiosta työssä valmistetusta oligonukleotidista voidaan jatkossa valmistaa myös muita happolabiileja oligonukleotidikonjugaatteja SPAAC-kemiaa hyödyntämällä. Rakennetta voitaisiin hyödyntää esimerkiksi vasta-ainekonjugaateissa.

5. Viitteet

1. Luna Velez, M. V., Verhaegh, G. W., Smit, F., Sedelaar, J. P. M. & Schalken, J. A. Suppression of prostate tumor cell survival by antisense oligonucleotide-mediated inhibition of AR-V7 mRNA synthesis. *Oncogene* **38**, 3696–3709 (2019).
2. Ngamcherdtrakul, W., Castro, D. J., Gu, S., Morry, J., Reda, M., Gray, J. W. & Yantasee, W. Current development of targeted oligonucleotide-based cancer therapies: Perspective on HER2-positive breast cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **45**, 19–29 (2016).
3. Roh, H., Pippin, J., Boswell, C. & Drebin, J. A. Antisense oligonucleotides specific for the HER2/neu oncogene inhibit the growth of human breast carcinoma cells that overexpress HER2/neu. *J. Surg. Res.* **77**, 85–90 (1998).
4. Rinaldi, C. & Wood, M. J. A. Antisense oligonucleotides: The next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 9–21 (2018).
5. Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L. P., Alfano, L., Gomez, A. M., Lewis, S., Kota, J., Malik, V., Shontz, K., Walker, C. M., Flanigan, K. M., Corridore, M., Kean, J. R., Allen, H. D., Shilling, C., Melia, K. R., Sazani, P., Saoud, J. B. & Kaye, E. M. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **74**, 637–647 (2013).
6. Finkel, R. S., Chiriboga, C. A., Vajsaar, J., Day, J. W., Montes, J., De Vivo, D. C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E., Norris, D. A., Xia, S., Bennett, C. F. & Bishop, K. M. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* **388**, 3017–3026

- (2016).
7. Roberts, T. C., Langer, R. & Wood, M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 673–694 (2020).
 8. Simoens, S. & Huys, I. Market access of Spinraza (Nusinersen) for spinal muscular atrophy: Intellectual property rights, pricing, value and coverage considerations. *Gene Ther.* **24**, 539–541 (2017).
 9. Messina, S. & Sframeli, M. New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. *J. Clin. Med.* **9**, 2222 (2020).
 10. Juliano, R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6518–6548 (2016).
 11. Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. & Anderson, D. G. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol. Ther.* **20**, 513–524 (2012).
 12. Whitehead, K. A., Langer, R. & Anderson, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 129–138 (2009).
 13. Behlke, M. A. Chemical Modification of siRNAs for In Vivo Use. *Oligonucleotides* **18**, 305–319 (2008).
 14. Meade, B. R., Gogoi, K., Hamil, A. S., Palm-Apergi, C., Van Den Berg, A., Hagopian, J. C., Springer, A. D., Eguchi, A., Kacsinta, A. D., Dowdy, C. F., Presente, A., Lönn, P., Kaulich, M., Yoshioka, N., Gros, E., Cui, X. S. & Dowdy, S. F. Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1256–1261 (2014).
 15. Alam, M. R., Ming, X., Fisher, M., Lackey, J. G., Rajeev, K. G., Manoharan, M. & Juliano, R. L. Multivalent cyclic RGD conjugates for targeted delivery of small interfering RNA. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1673–1681 (2011).
 16. Eguchi, A., Meade, B. R., Chang, Y. C., Fredrickson, C. T., Willert, K., Puri, N. & Dowdy, S. F. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat. Biotechnol.* **27**, 567–571 (2009).
 17. Ämmälä, C., Drury, W. J., Knerr, L., Ahlstedt, I., Stillemark-Billton, P., Wennberg-Huldt, C., Andersson, E. M., Valeur, E., Jansson-Löfmark, R., Janzén, D., Sundström, L., Meuller, J., Claesson, J., Andersson, P., Johansson, C., Lee, R. G., Prakash, T. P., Seth, P. P., Monia, B. P. & Andersson, S. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to pancreatic β -cells. *Sci. Adv.* **4**, eaat3386 (2018).

18. Tushir-Singh, J. Antibody-siRNA conjugates: drugging the undruggable for anti-leukemic therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 325–338 (2017).
19. Song, E., Zhu, P., Lee, S. K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D. M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D. B., Shankar, P., Marasco, W. A. & Lieberman, J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.* **23**, 709–717 (2005).
20. Matsuda, S., Keiser, K., Nair, J. K., Charisse, K., Manoharan, R. M., Kretschmer, P., Peng, C. G., Kel'in, A. V., 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.* **10**, 1181–1187 (2015).
21. Nair, J. K., Willoughby, J. L. S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M. R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kelin, 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. C., Maier, M. A., Rajeev, K. G. & Manoharan, M. Multivalent N -acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16958–16961 (2014).
22. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. & Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, 607–609 (1996).
23. Juliano, R. L., Ming, X. & Nakagawa, O. Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **23**, 147–157 (2012).
24. Patel, P. C., Giljohann, D. A., Daniel, W. L., Zheng, D., Prigodich, A. E. & Mirkin, C. A. Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **21**, 2250–2256 (2010).
25. Dastpeyman, M., Sharifi, R., Amin, A., Karas, J. A., Cuic, B., Pan, Y., Nicolazzo, J. A., Turner, B. J. & Shabanpoor, F. Endosomal escape cell-penetrating peptides significantly enhance pharmacological effectiveness and CNS activity of systemically administered antisense oligonucleotides. *Int. J. Pharm.* **599**, 120398 (2021).
26. Seferos, D. S., Prigodich, A. E., Giljohann, D. A., Patel, P. C. & Mirkin, C. A.

- Polyvalent DNA nanoparticle conjugates stabilize nucleic acids. *Nano Lett.* **9**, 308–311 (2009).
27. Winkler, J. Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Ther. Deliv.* **4**, 791–809 (2013).
 28. Dovgan, I., Koniev, O., Kolodych, S. & Wagner, A. Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconjug. Chem.* **30**, 2483–2501 (2019).
 29. Bargh, J. D., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S. & Spring, D. R. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 4361–4374 (2019).
 30. Järver, P., Coursindel, T., Andaloussi, S. El, Godfrey, C., Wood, M. J. & Gait, M. J. Peptide-mediated cell and in vivo delivery of antisense oligonucleotides and siRNA. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **1**, e27 (2012).
 31. Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Grinstaff, M. W. & Barthélémy, P. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjug. Chem.* **30**, 366–383 (2019).
 32. Aho, A., Sulkanen, M., Korhonen, H. & Virta, P. Conjugation of Oligonucleotides to Peptide Aldehydes via a pH-Responsive *N*-Methoxyoxazolidine Linker. *Org. Lett.* **22**, 6714–6718 (2020).
 33. Aho, A., Äärelä, A., Korhonen, H. & Virta, P. Expanding the Scope of the Cleavable *N*-(methoxy)oxazolidine Linker for the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Molecules* **26**, 490 (2021).
 34. Ollivier, N., Olivier, C., Gouyette, C., Huynh-Dinh, T., Gras-Masse, H. & Melnyk, O. Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* **43**, 997–999 (2002).
 35. Lee, C. C., Gillies, E. R., Fox, M. E., Guillaudeu, S. J., Fréchet, J. M. J., Dy, E. E. & Szoka, F. C. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16649–16654 (2006).
 36. Hrubý, M., Koňák, Č. & Ulbrich, K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J. Control. Release* **103**, 137–148 (2005).
 37. Saito, G., Swanson, J. A. & Lee, K. D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: Role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 199–215 (2003).
 38. Rajur, S. B., Roth, C. M., Morgan, J. R. & Yarmush, M. L. Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules.

- Bioconjug. Chem.* **8**, 935–940 (1997).
39. Feener, E. P., Shen, W. C. & Ryser, H. J. P. Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J. Biol. Chem.* **265**, 18780–18785 (1990).
 40. Meyer, A., Spinelli, N., Dumy, P., Vasseur, J. J., Morvan, F. & Defrancq, E. Oligonucleotide sequential bis-conjugation via click-oxime and click-huisgen procedures. *J. Org. Chem.* **75**, 3927–3930 (2010).
 41. Wada, F., Yamamoto, T., Ueda, T., Sawamura, M., Wada, S., Harada-Shiba, M. & Obika, S. Cholesterol-GalNAc dual conjugation strategy for reducing renal distribution of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **28**, 50–57 (2018).
 42. Li, H., Zhang, B., Lu, X., Tan, X., Jia, F., Xiao, Y., Cheng, Z., Li, Y., Silva, D. O., Schrekker, H. S., Zhang, K. & Mirkin, C. A. Molecular spherical nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4340–4344 (2018).
 43. Cutler, J. I., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. Spherical nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1376–1391 (2012).
 44. Lee, J. S., Lytton-Jean, A. K. R., Hurst, S. J. & Mirkin, C. A. Silver nanoparticle - Oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties. *Nano Lett.* **7**, 2112–2115 (2007).
 45. Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K. R. & Mirkin, C. A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal. Chem.* **78**, 8313–8318 (2006).
 46. Lytton-Jean, A. K. R. & Mirkin, C. A. A thermodynamic investigation into the binding properties of DNA functionalized gold nanoparticle probes and molecular fluorophore probes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12754–12755 (2005).
 47. Mitchell, G. P., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8122–8123 (1999).
 48. Sprangers, A. J., Hao, L., Banga, R. J. & Mirkin, C. A. Liposomal Spherical Nucleic Acids for Regulating Long Noncoding RNAs in the Nucleus. *Small* **13**, 1602753 (2017).
 49. Banga, R. J., Chernyak, N., Narayan, S. P., Nguyen, S. T. & Mirkin, C. A. Liposomal spherical nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9866–9869 (2014).
 50. Meckes, B., Banga, R. J., Nguyen, S. B. T. & Mirkin, C. A. Enhancing the Stability and Immunomodulatory Activity of Liposomal Spherical Nucleic Acids through Lipid-Tail DNA Modifications. *Small* **14**, 1702909 (2018).
 51. Brodin, J. D., Sprangers, A. J., McMillan, J. R. & Mirkin, C. A. DNA-Mediated Cellular Delivery of Functional Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 14838–14841

- (2015).
52. Kusmierz, C. D., Bujold, K. E., Callmann, C. E. & Mirkin, C. A. Defining the Design Parameters for in Vivo Enzyme Delivery through Protein Spherical Nucleic Acids. *ACS Cent. Sci.* **6**, 815–822 (2020).
 53. Brodin, J. D., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. DNA-mediated engineering of multicomponent enzyme crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4564–4569 (2015).
 54. Cutler, J. I., Zhang, K., Zheng, D., Auyeung, E., Prigodich, A. E. & Mirkin, C. A. Polyvalent nucleic acid nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9254–9257 (2011).
 55. Wu, X. A., Choi, C. H. J., Zhang, C., Hao, L. & Mirkin, C. A. Intracellular fate of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 7726–7733 (2014).
 56. Massich, M. D., Giljohann, D. A., Schmucker, A. L., Patel, P. C. & Mirkin, C. A. Cellular response of polyvalent oligonucleotide - Gold nanoparticle conjugates. *ACS Nano* **4**, 5641–5646 (2010).
 57. Massich, M. D., Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Ludlow, L. E., Horvath, C. M. & Mirkin, C. A. Regulating immune response using polyvalent nucleic acid-gold nanoparticle conjugates. *Mol. Pharm.* **6**, 1934–1940 (2009).
 58. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Prigodich, A. E., Patel, P. C. & Mirkin, C. A. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2072–2073 (2009).
 59. Choi, C. H. J., Hao, L., Narayan, S. P., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7625–7630 (2013).
 60. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C. & Mirkin, C. A. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3280–3294 (2010).
 61. Rosi, N. L., Giljohann, D. A., Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K. R., Han, M. S. & Mirkin, C. A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science (80-.)*. **312**, 1027–1030 (2006).
 62. Jensen, S. A., Day, E. S., Ko, C. H., Hurley, L. A., Luciano, J. P., Kouri, F. M., Merkel, T. J., Luthi, A. J., Patel, P. C., Cutler, J. I., Daniel, W. L., Scott, A. W., Rotz, M. W., Meade, T. J., Giljohann, D. A., Mirkin, C. A. & Stegh, A. H. Spherical nucleic acid nanoparticle conjugates as an RNAi-based therapy for

- glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **5**, 209ra152 (2013).
63. Haraldsson, B., Nyström, J. & Deen, W. M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol. Rev.* **88**, 451–487 (2008).
 64. Chinen, A. B., Guan, C. M., Ko, C. H. & Mirkin, C. A. The Impact of Protein Corona Formation on the Macrophage Cellular Uptake and Biodistribution of Spherical Nucleic Acids. *Small* **13**, 1603847 (2017).
 65. Zhang, W., Meckes, B. & Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acids with Tailored and Active Protein Coronae. *ACS Cent. Sci.* **5**, 1983–1990 (2019).
 66. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
 67. Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 145–150 (2008).
 68. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Patel, P. C., Millstone, J. E., Rosi, N. L. & Mirkin, C. A. Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. *Nano Lett.* **7**, 3818–3821 (2007).
 69. Narayan, S. P., Choi, C. H. J., Hao, L., Calabrese, C. M., Auyeung, E., Zhang, C., Goor, O. J. G. M. & Mirkin, C. A. The Sequence-Specific Cellular Uptake of Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates. *Small* **11**, 4173–4182 (2015).
 70. Chinen, A. B., Guan, C. M. & Mirkin, C. A. Spherical nucleic acid nanoparticle conjugates enhance G-quadruplex formation and increase serum protein interactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 527–531 (2015).
 71. Pearson, A. M., Rich, A. & Krieger, M. Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J. Biol. Chem.* **268**, 3546–3554 (1993).
 72. Kumthekar, P., Ko, C. H., Paunesku, T., Dixit, K., Sonabend, A. M., Bloch, O., Tate, M., Schwartz, M., Zuckerman, L., Lezon, R., Lukas, R. V., Jovanovic, B., McCortney, K., Colman, H., Chen, S., Lai, B., Antipova, O., Deng, J., Li, L., Tommasini-Ghelfi, S., Hurley, L. A., Unruh, D., Sharma, N. V., Kandpal, M., Kouri, F. M., Davuluri, R. V., Brat, D. J., Muzzio, M., Glass, M., Vijayakumar, V., Heidel, J., Giles, F. J., Adams, A. K., James, C. D., Woloschak, G. E., Horbinski, C. & Stegh, A. H. A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference-based spherical nucleic acids in patients with recurrent glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **13**, eabb3945 (2021).
 73. Patel, P. C., Hao, L., Au Yeung, W. S. & Mirkin, C. A. Duplex end breathing

- determines serum stability and intracellular potency of siRNA-Au NPs. *Mol. Pharm.* **8**, 1285–1291 (2011).
74. Yamankurt, G., Stawicki, R. J., Posadas, D. M., Nguyen, J. Q., Carthew, R. W. & Mirkin, C. A. The effector mechanism of siRNA spherical nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 1312–1320 (2020).
75. Nemati, H., Ghahramani, M.-H., Faridi-Majidi, R., Izadi, B., Bahrami, G., Madani, S.-H. & Tavoosidana, G. Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. *J. Control. Release* **268**, 259–268 (2017).
76. Randeria, P. S., Seeger, M. A., Wang, X.-Q., Wilson, H., Shipp, D., Mirkin, C. A. & Paller, A. S. siRNA-based spherical nucleic acids reverse impaired wound healing in diabetic mice by ganglioside GM3 synthase knockdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5573–5578 (2015).
77. Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: Fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632 (2007).
78. Zhang, C., Hao, L., Calabrese, C. M., Zhou, Y., Choi, C. H. J., Xing, H. & Mirkin, C. A. Biodegradable DNA-Brush Block Copolymer Spherical Nucleic Acids Enable Transfection Agent-Free Intracellular Gene Regulation. *Small* **11**, 5360–5368 (2015).
79. Mokhtarzadeh, A., Vahidnezhad, H., Youssefian, L., Mosafer, J., Baradaran, B. & Uitto, J. Applications of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles as Delivery Systems. *Trends Mol. Med.* **25**, 1066–1079 (2019).
80. Locke, I. C. & Carpenter, B. G. Ion-dependency of the streptococcal deoxyribonuclease ‘streptodornase’, an active constituent of the medicament Varidase®. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 482–489 (2002).
81. Barnaby, S. N., Perelman, G. A., Kohlstedt, K. L., Chinen, A. B., Schatz, G. C. & Mirkin, C. A. Design Considerations for RNA Spherical Nucleic Acids (SNAs). *Bioconjug. Chem.* **27**, 2124–2131 (2016).
82. Barnaby, S. N., Lee, A. & Mirkin, C. A. Probing the inherent stability of siRNA immobilized on nanoparticle constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9739–9744 (2014).
83. Prigodich, A. E., Alhasan, A. H. & Mirkin, C. A. Selective enhancement of nucleases by polyvalent DNA-functionalized gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2120–2123 (2011).
84. Jin, R., Wu, G., Li, Z., Mirkin, C. A. & Schatz, G. C. What controls the melting

- properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1643–1654 (2003).
85. Xu, J. & Craig, S. L. Thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13227–13231 (2005).
86. Chen, C., Wang, W., Ge, J. & Zhao, X. S. Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3756–3765 (2009).
87. Randeria, P. S., Jones, M. R., Kohlstedt, K. L., Banga, R. J., Olvera De La Cruz, M., Schatz, G. C. & Mirkin, C. A. What Controls the Hybridization Thermodynamics of Spherical Nucleic Acids? *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3486–3489 (2015).
88. Fong, L. K., Wang, Z., Schatz, G. C., Luijten, E. & Mirkin, C. A. The Role of Structural Enthalpy in Spherical Nucleic Acid Hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 6226–6230 (2018).
89. Taton, T. A., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science (80-.)*. **289**, 1757–1760 (2000).
90. Qin, L., Wang, S., Dominguez, D., Long, A., Chen, S., Fan, J., Ahn, J., Skakuj, K., Huang, Z., Lee, A., Mirkin, C. & Zhang, B. Development of Spherical Nucleic Acids for Prostate Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **11**, 1333 (2020).
91. Guan, C., Chernyak, N., Dominguez, D., Cole, L., Zhang, B. & Mirkin, C. A. RNA-Based Immunostimulatory Liposomal Spherical Nucleic Acids as Potent TLR7/8 Modulators. *Small* **14**, 1803284 (2018).
92. Radovic-Moreno, A. F., Chernyak, N., Mader, C. C., Nallagatla, S., Kang, R. S., Hao, L., Walker, D. A., Halo, T. L., Merkel, T. J., Rische, C. H., Anantatmula, S., Burkhart, M., Mirkin, C. A. & Gryaznov, S. M. Immunomodulatory spherical nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3892–3897 (2015).
93. Hsiao, J. C., Buryska, T., Kim, E., Howes, P. D. & Demello, A. J. Tuning DNA-nanoparticle conjugate properties allows modulation of nuclease activity. *Nanoscale* **13**, 4956–4970 (2021).
94. Hill, H. D., Millstone, J. E., Banholzer, M. J. & Mirkin, C. A. The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano* **3**, 418–424 (2009).
95. Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L. & Mirkin, C. A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science (80-.)*. **277**, 1078–

- 1081 (1997).
96. Dougan, J. A., Karlsson, C., Smith, W. E. & Graham, D. Enhanced oligonucleotide-nanoparticle conjugate stability using thioctic acid modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3668–3675 (2007).
 97. Demers, L. M., Mirkin, C. A., Mucic, R. C., Reynolds, R. A., Letsinger, R. L., Elghanian, R. & Viswanadham, G. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal. Chem.* **72**, 5535–5541 (2000).
 98. Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Sequence-dependent stability of DNA-modified gold nanoparticles. *Langmuir* **18**, 6666–6670 (2002).
 99. Demers, L. M., Östblom, M., Zhang, H., Jang, N. H., Liedberg, B. & Mirkin, C. A. Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11248–11249 (2002).
 100. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (80-.)*. **311**, 622–627 (2006).
 101. Chompoosor, A., Saha, K., Ghosh, P. S., MacArthy, D. J., Miranda, O. R., Zhu, Z. J., Arcaro, K. F. & Rotello, V. M. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small* **6**, 2246–2249 (2010).
 102. Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W. H., Surprenant, A., Lopez-Castejon, G., Mann, S., Davis, S. A., Hails, L. A., Ingham, E., Verkade, P., Lane, J., Heesom, K., Newson, R. & Case, C. P. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 876–883 (2009).
 103. Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. & Jahnke-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **3**, 1941–1949 (2007).
 104. Seferos, D. S., Giljohann, D. A., Hill, H. D., Prigodich, A. E. & Mirkin, C. A. Nano-flares: Probes for transfection and mRNA detection in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15477–15479 (2007).
 105. Schaeublin, N. M., Braydich-Stolle, L. K., Maurer, E. I., Park, K., MacCuspie, R. I., Afroz, A. R. M. N., Vaia, R. A., Saleh, N. B. & Hussain, S. M. Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model. *Langmuir*

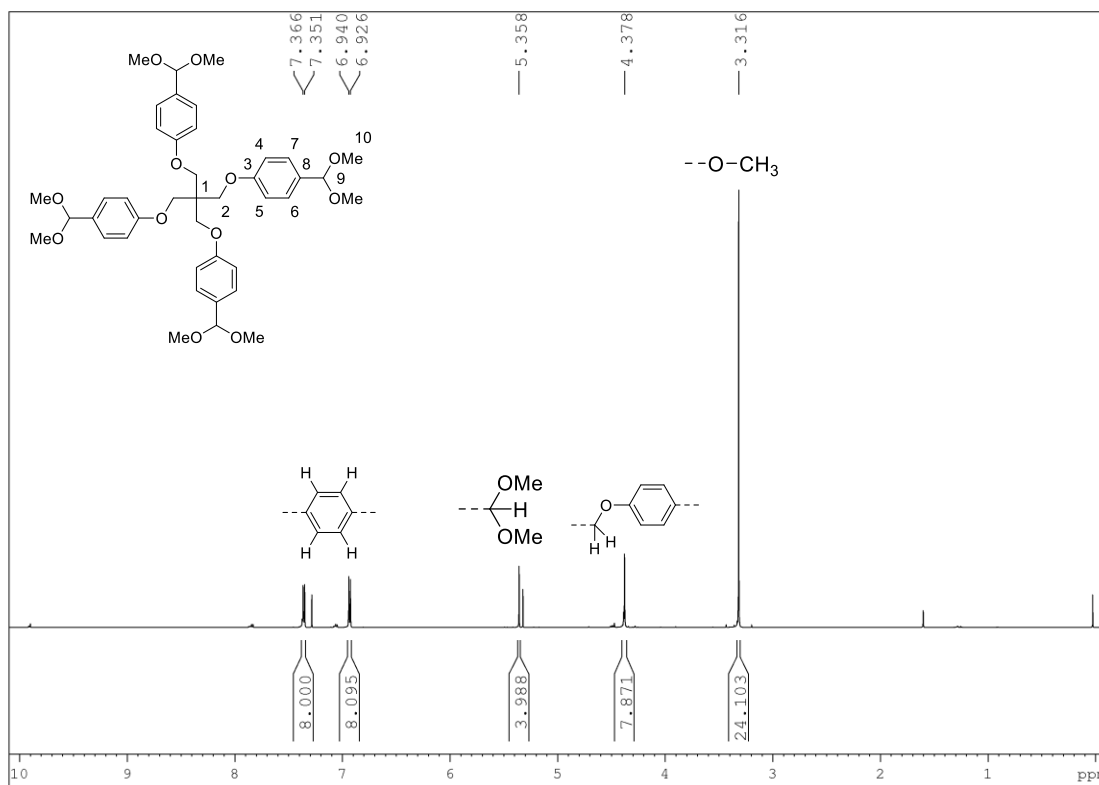
- 28**, 3248–3258 (2012).
106. Gunduz, N., Ceylan, H., Guler, M. O. & Tekinay, A. B. Intracellular Accumulation of Gold Nanoparticles Leads to Inhibition of Macropinocytosis to Reduce the Endoplasmic Reticulum Stress. *Sci. Rep.* **7**, 40493 (2017).
 107. Fraga, S., Brandão, A., Soares, M. E., Morais, T., Duarte, J. A., Pereira, L., Soares, L., Neves, C., Pereira, E., Bastos, M. de L. & Carmo, H. Short- and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous administration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 1757–1766 (2014).
 108. Falagan-Lotsch, P., Grzincic, E. M. & Murphy, C. J. One low-dose exposure of gold nanoparticles induces long-term changes in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 13318–13323 (2016).
 109. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
 110. Zhu, S., Xing, H., Gordiichuk, P., Park, J. & Mirkin, C. A. PLGA Spherical Nucleic Acids. *Adv. Mater.* **30**, 1707113 (2018).
 111. Tan, X., Li, B. B., Lu, X., Jia, F., Santori, C., Menon, P., Li, H., Zhang, B., Zhao, J. J. & Zhang, K. Light-triggered, self-immolative nucleic acid-drug nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6112–6115 (2015).
 112. Fukumoto, S., Kawade, M., Kimura, K., Akiyama, Y. & Kikuchi, A. Preparation of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles Containing Self-Immolative Poly(carbamate) Core. *Anal. Sci.* **37**, 781–784 (2021).
 113. Ferrer, J. R., Sinegra, A. J., Ivancic, D., Yeap, X. Y., Qiu, L., Wang, J. J., Zhang, Z. J., Wertheim, J. A. & Mirkin, C. A. Structure-Dependent Biodistribution of Liposomal Spherical Nucleic Acids. *ACS Nano* **14**, 1682–1693 (2020).
 114. Yan, J., Tan, Y. L., Lin, M.-J., Xing, H. & Jiang, J.-H. A DNA-mediated crosslinking strategy to enhance cellular delivery and sensor performance of protein spherical nucleic acids. *Chem. Sci.* **12**, 1803–1809 (2021).
 115. Samanta, D., Ebrahimi, S. B., Kusmierz, C. D., Cheng, H. F. & Mirkin, C. A. Protein Spherical Nucleic Acids for Live-Cell Chemical Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 13350–13355 (2020).
 116. Young, K. L., Scott, A. W., Hao, L., Mirkin, S. E., Liu, G. & Mirkin, C. A. Hollow spherical nucleic acids for intracellular gene regulation based upon biocompatible silica shells. *Nano Lett.* **12**, 3867–3871 (2012).

117. Zhang, K., Cutler, J. I., Zhang, J., Zheng, D., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. Nanopod formation through gold nanoparticle templated and catalyzed cross-linking of polymers bearing pendant propargyl ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15151–15153 (2010).
118. Park, J. H., Gu, L., Von Maltzahn, G., Ruoslahti, E., Bhatia, S. N. & Sailor, M. J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat. Mater.* **8**, 331–336 (2009).
119. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* **151**, 220–228 (2011).
120. Cuellar, T. L., Barnes, D., Nelson, C., Tanguay, J., Yu, S.-F., Wen, X., Scales, S. J., Gesch, J., Davis, D., Van Brabant Smith, A., Leake, D., Vandlen, R. & Siebel, C. W. Systematic evaluation of antibody-mediated siRNA delivery using an industrial platform of THIOMAB-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res.* **43**, 1189–1203 (2015).
121. Meschaninova, M. I., Entelis, N. S., Chernolovskaya, E. L. & Venyaminova, A. G. A Versatile Solid-Phase Approach to the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates with Biodegradable Hydrazone Linker. *Molecules* **26**, 2119 (2021).
122. Achilles, K. & Kiedrowski, G. V. Kinetic model studies on the chemical ligation of oligonucleotides via hydrazone formation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **15**, 1229–1233 (2005).
123. Kozlov, I. A., Melnyk, P. C., Stromborg, K. E., Chee, M. S., Barker, D. L. & Zhao, C. Efficient Strategies for the Conjugation of Oligonucleotides to Antibodies Enabling Highly Sensitive Protein Detection. *Biopolymers* **73**, 621–630 (2004).
124. Kölmel, D. K. & Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **117**, 10358–10376 (2017).
125. Kalia, J. & Raines, R. T. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 7523–7526 (2008).
126. Hamann, P. R., Hinman, L. M., Hollander, I., Beyer, C. F., Lindh, D., Holcomb, R., Hallett, W., Tsou, H.-R., Upešlaciš, J., Shochat, D., Mountain, A., Flowers, D. A. & Bernstein, I. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody - Calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug. Chem.* **13**, 47–58 (2002).
127. Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cerveny, C. G., Chace, D. F., DeBlanc, R. L., Gearing, R. P., Bovee, T. D., Siegall, C. B.,

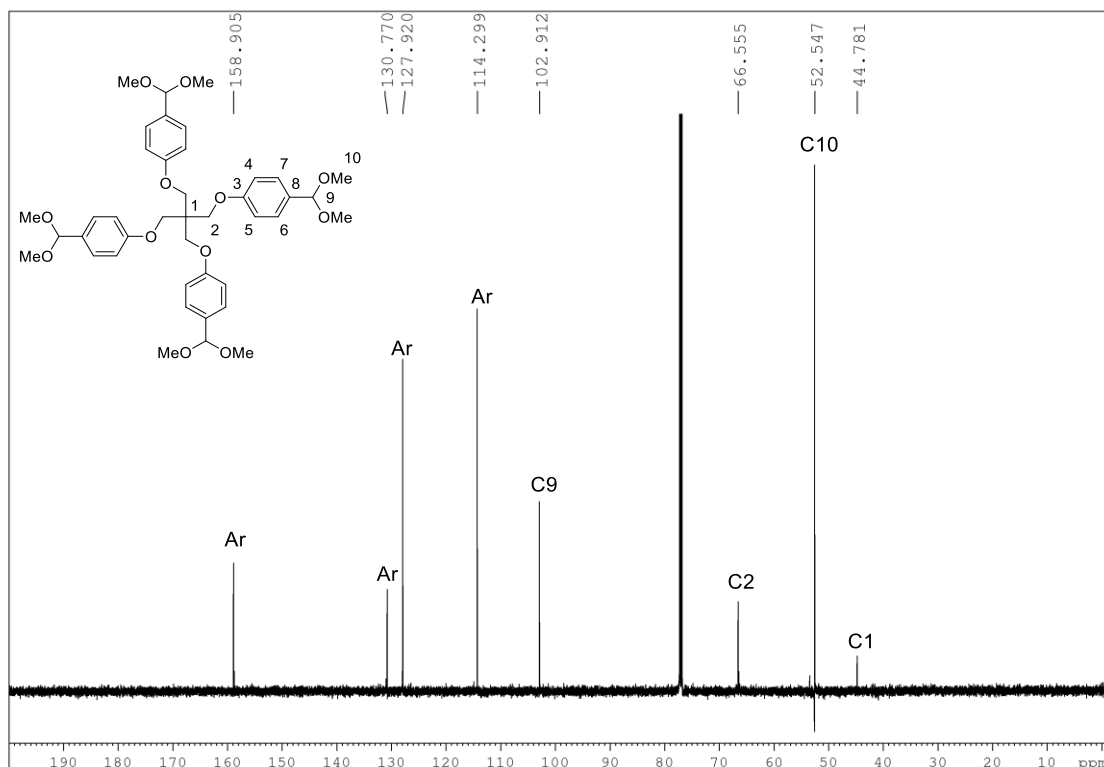
- Francisco, J. A., Wahl, A. F., Meyer, D. L. & Senter, P. D. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* **21**, 778–784 (2003).
128. Vaughn, J. P., Iglehart, J. D., Demirdji, S., Davis, P., Babiss, L. E., Caruthers, M. H. & Marks, J. R. Antisense DNA downregulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8338–8342 (1995).
129. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13518–13519 (2008).
130. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A. & Boons, G. J. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 2253–2255 (2008).
131. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A. & Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16793–16797 (2007).
132. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11486–11493 (2008).
133. Pon, R. T. Solid-phase Supports for Oligonucleotide Synthesis. Kirjassa Agrawal, S. (eds) *Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Methods in Molecular Biology, vol 20*. 1. painos; Humana Press, Totowa, NJ, Yhdysvallat, 1993. s. 467-468 doi:10.1385/0896032817.

6. Liitteet

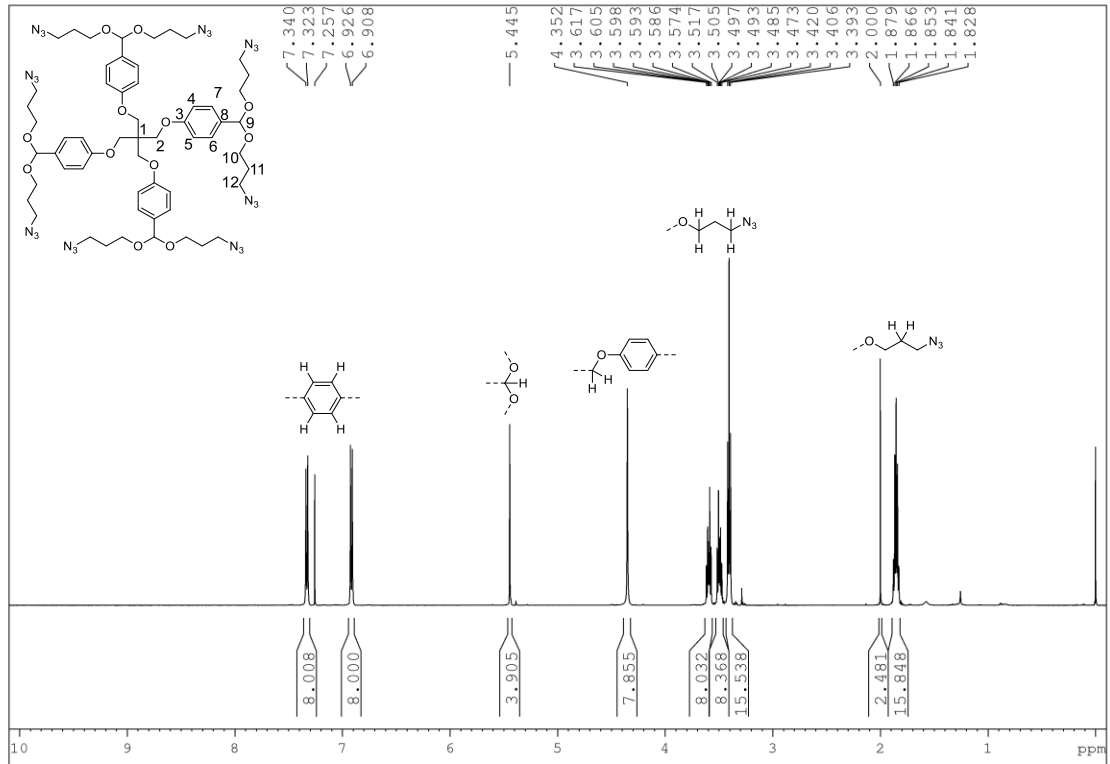
Liite 1. PET-asetalin (7) ^1H -NMR-spektri



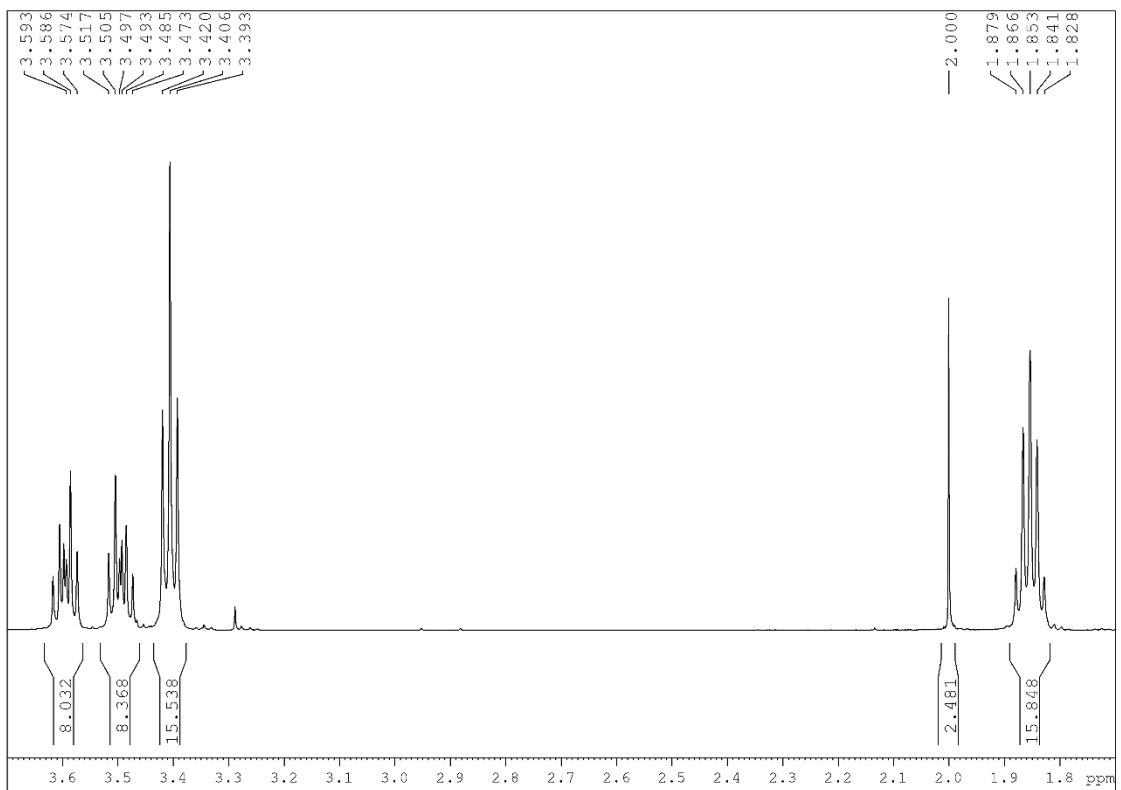
Liite 2. PET-asetalin (7) ^{13}C -NMR-spektri



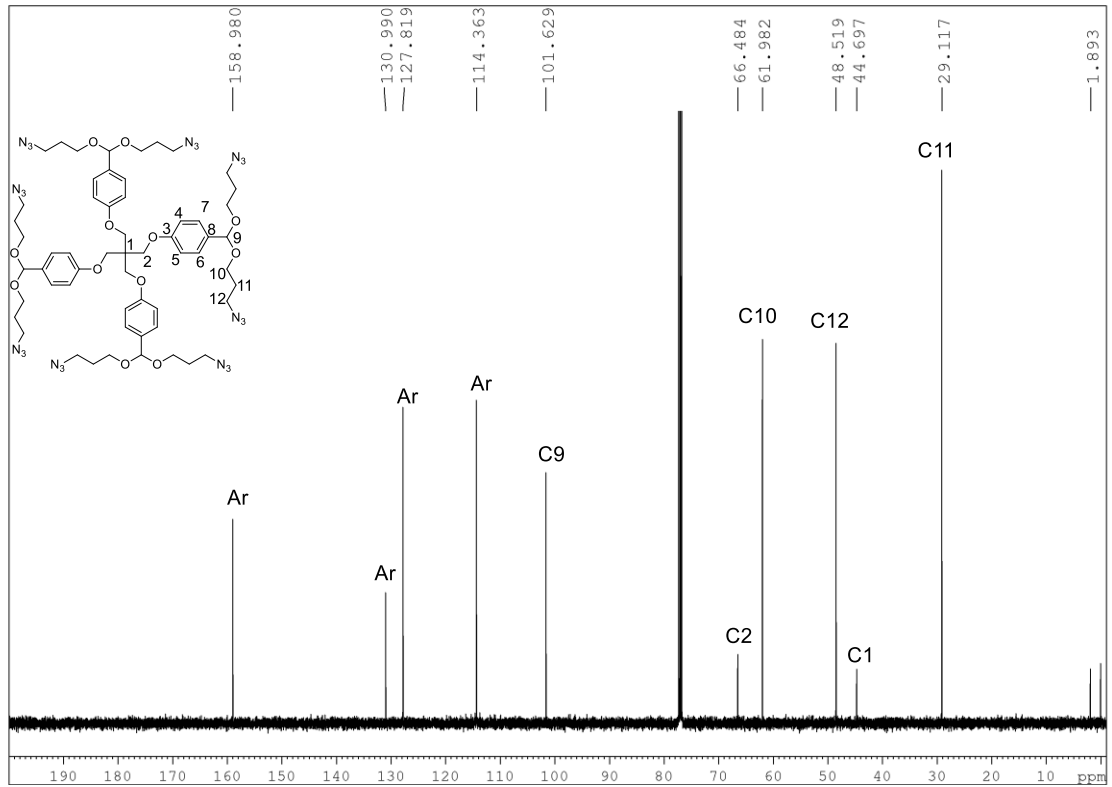
Liite 3. PET-keskusrakenteen (9) $^1\text{H-NMR}$ -spektri



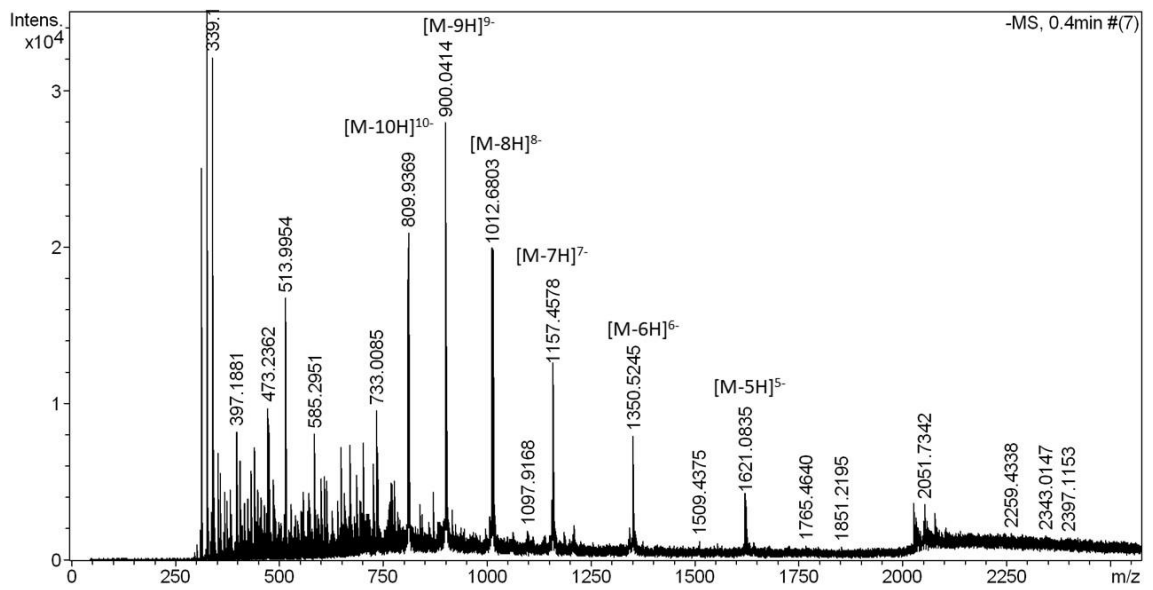
Liite 4. Lähennetty PET-keskusrakenteen (9) $^1\text{H-NMR}$ -spektri



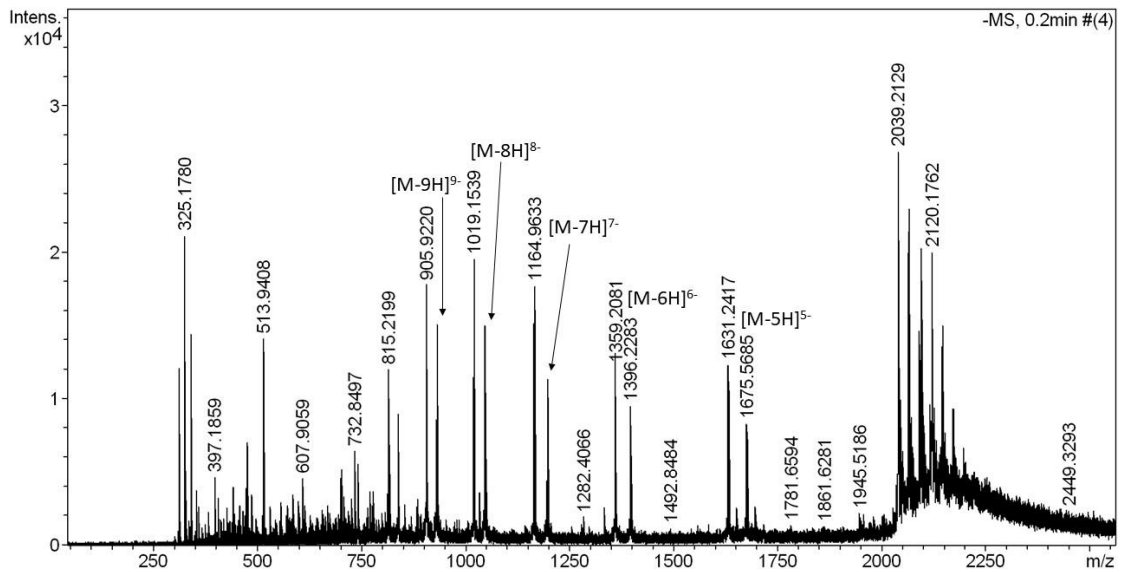
Liite 5. PET-keskusrakenteen (9) ^{13}C -NMR-spektri



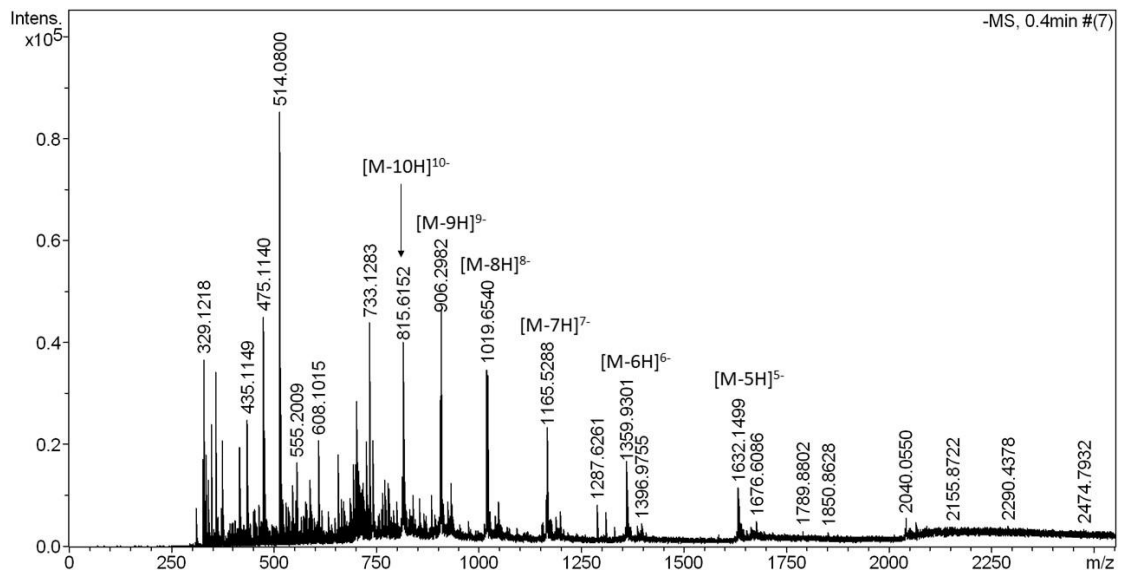
Liite 6. Oligonukleotidin ON1 massaspektri



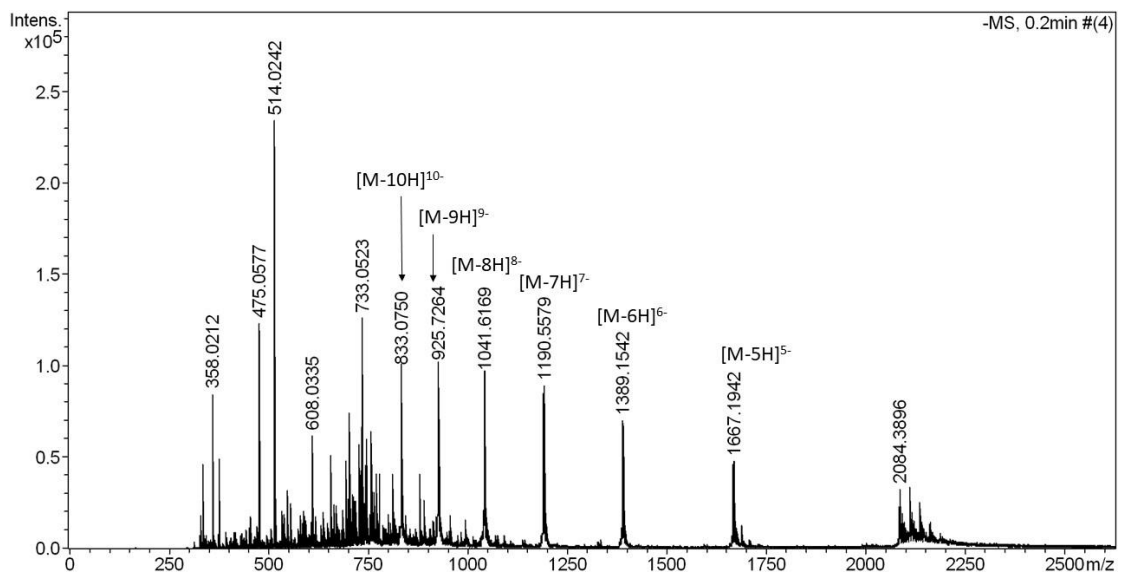
Liite 7. Oligonukleotidin ON2 massaspektri



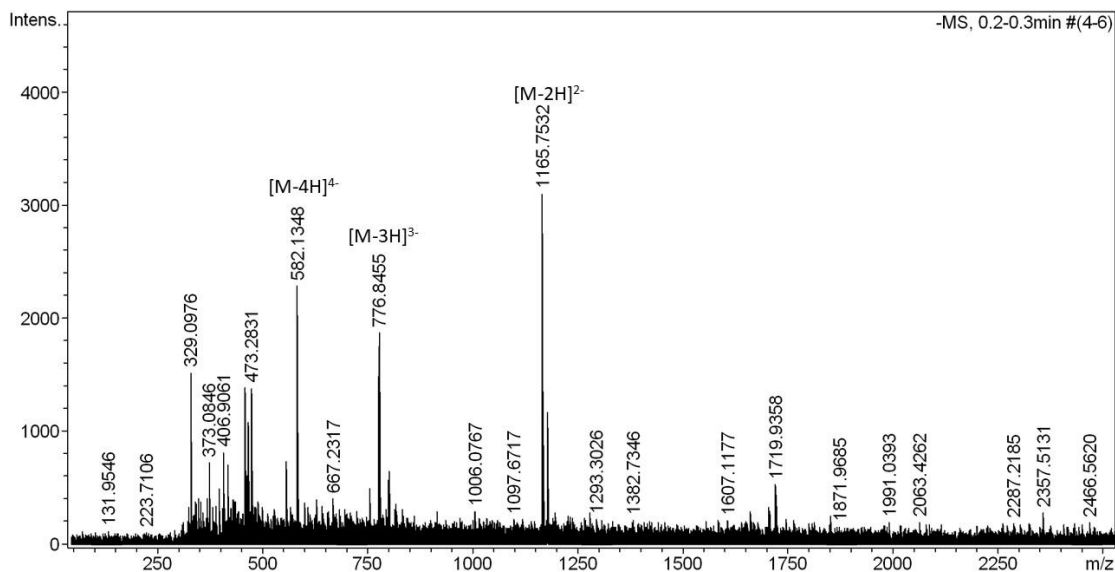
Liite 8. Oligonukleotidin ON3 massaspektri



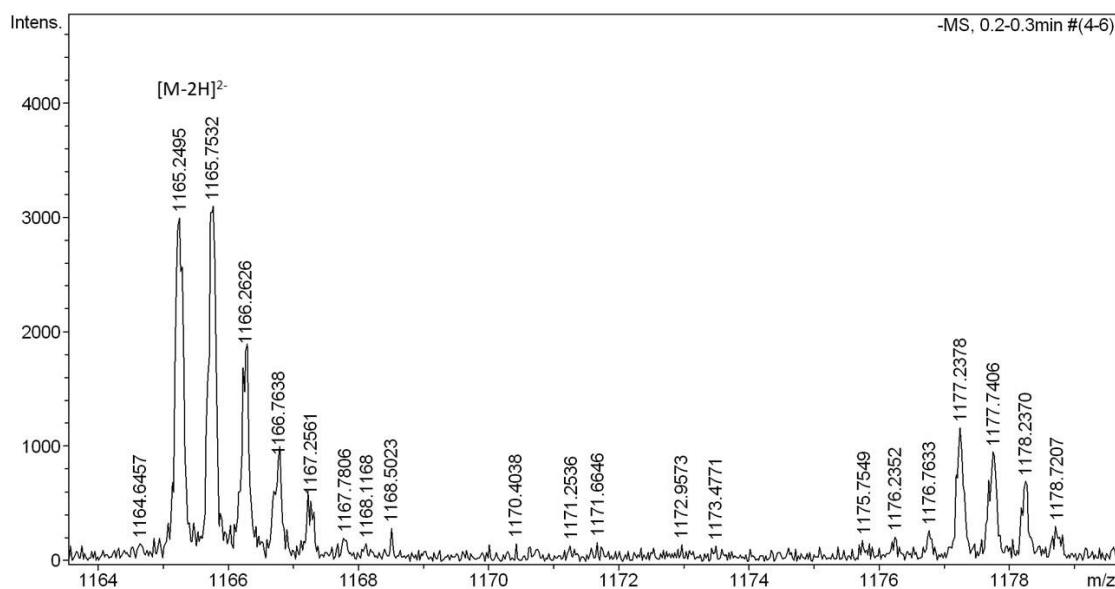
Liite 9. Oligonukleotidin ON4 massaspektri



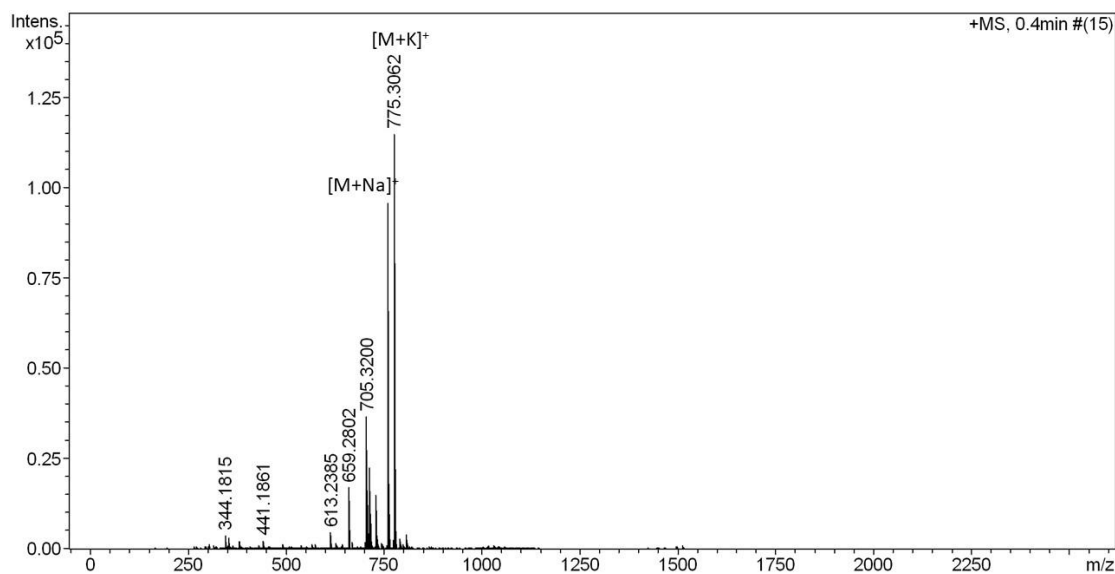
Liite 10. Oligonukleotidin **ON5** massaspektri



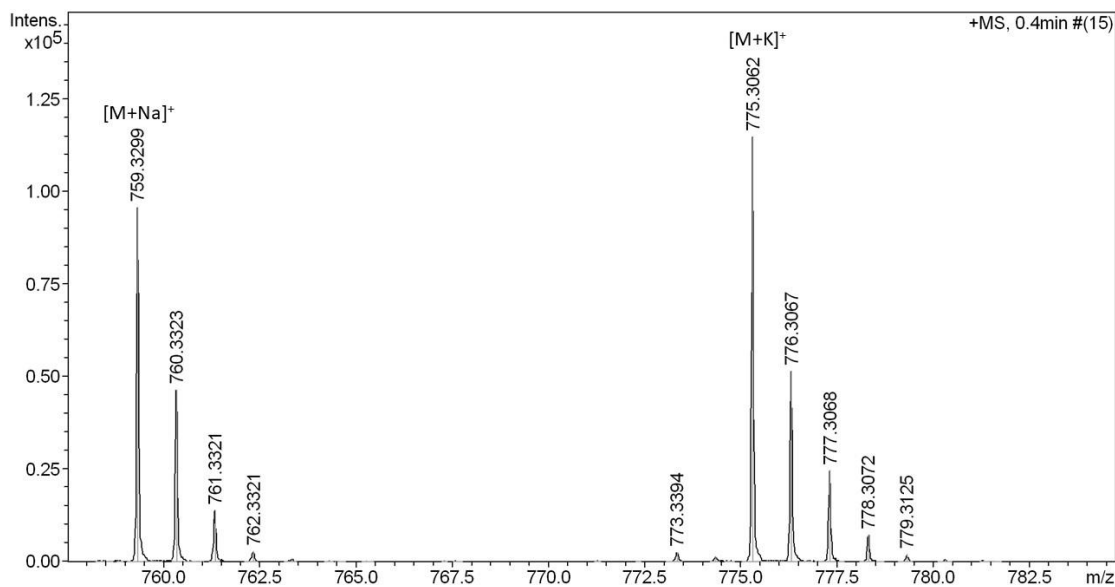
Liite 11. Lähennetty oligonukleotidin **ON5** massaspektri



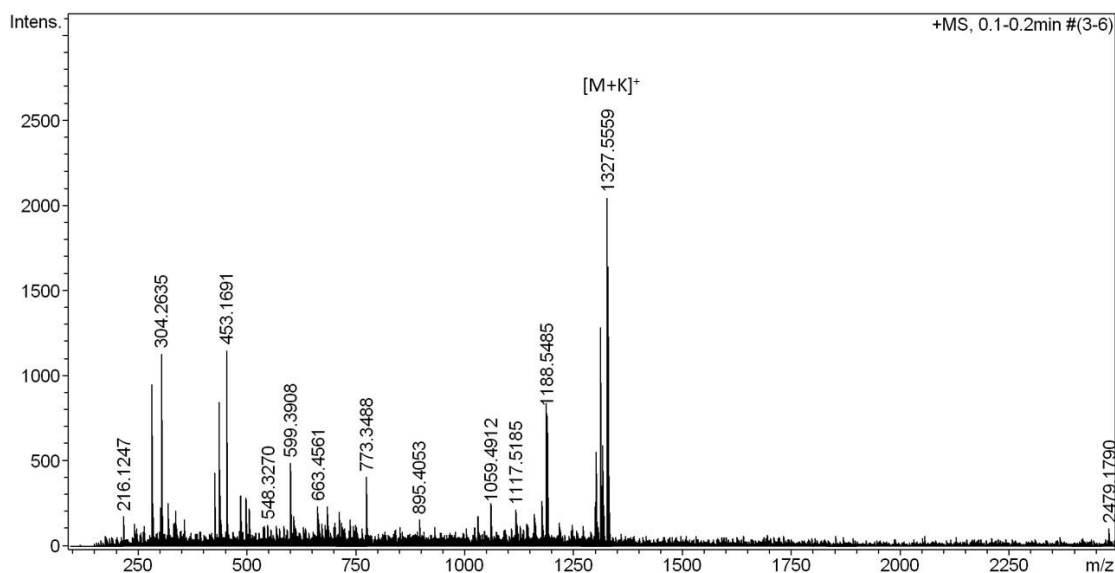
Liite 12. PET-asettiin (**7**) massaspektri



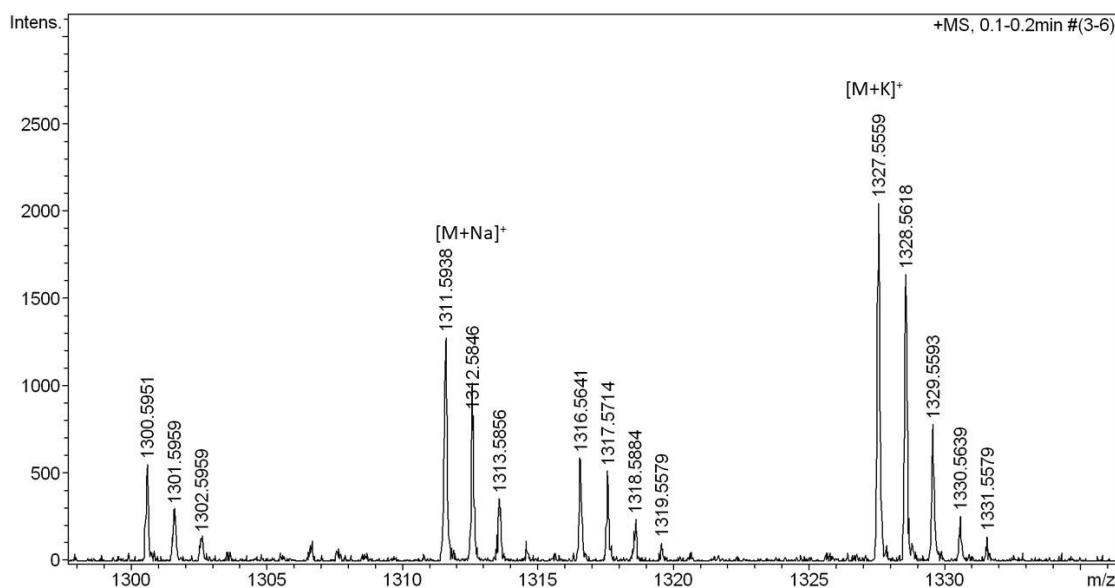
Liite 13. Lähennetty PET-asetaalin (7) massaspektri



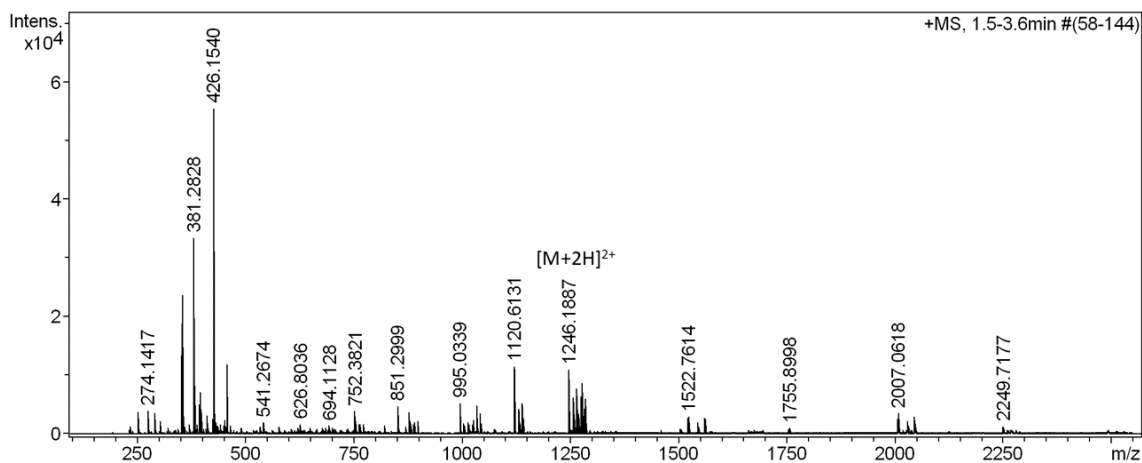
Liite 14. PET-keskusrakenteen (9) massaspektri



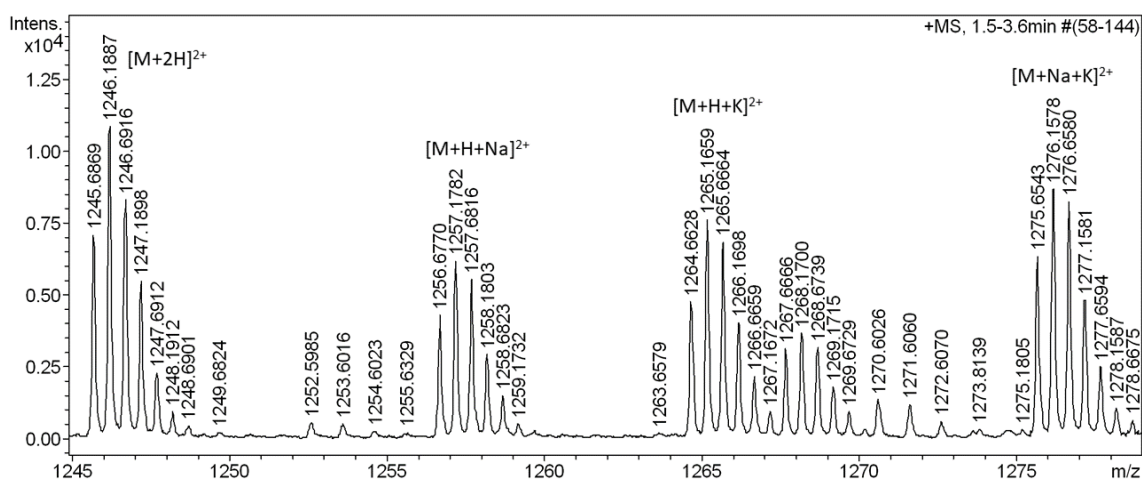
Liite 15. Lähennetty PET-keskusrakenteen (9) massaspektri



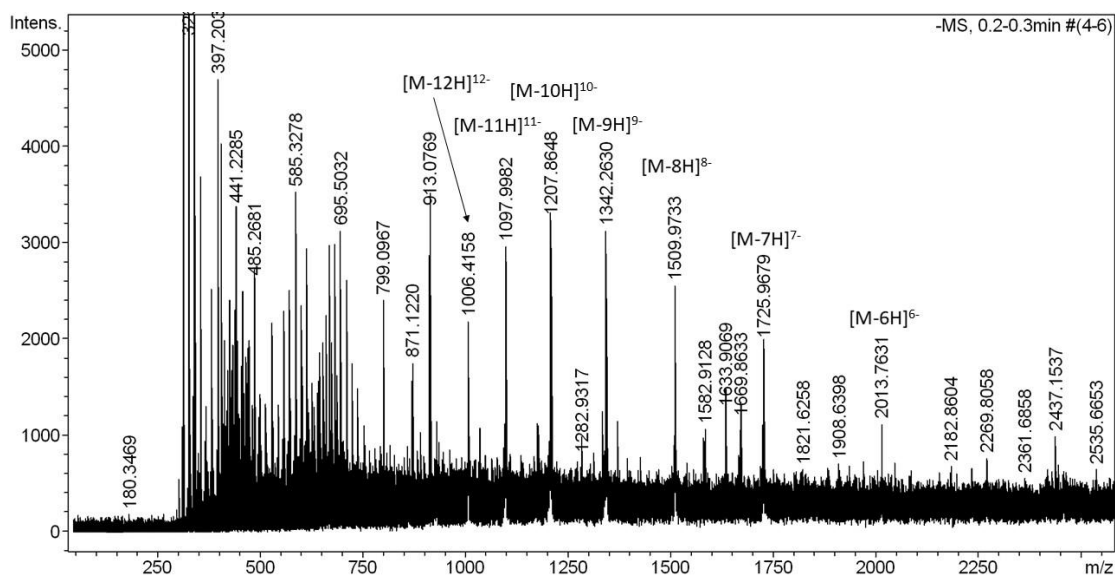
Liite 16. Yhdisteen **13** massaspektri



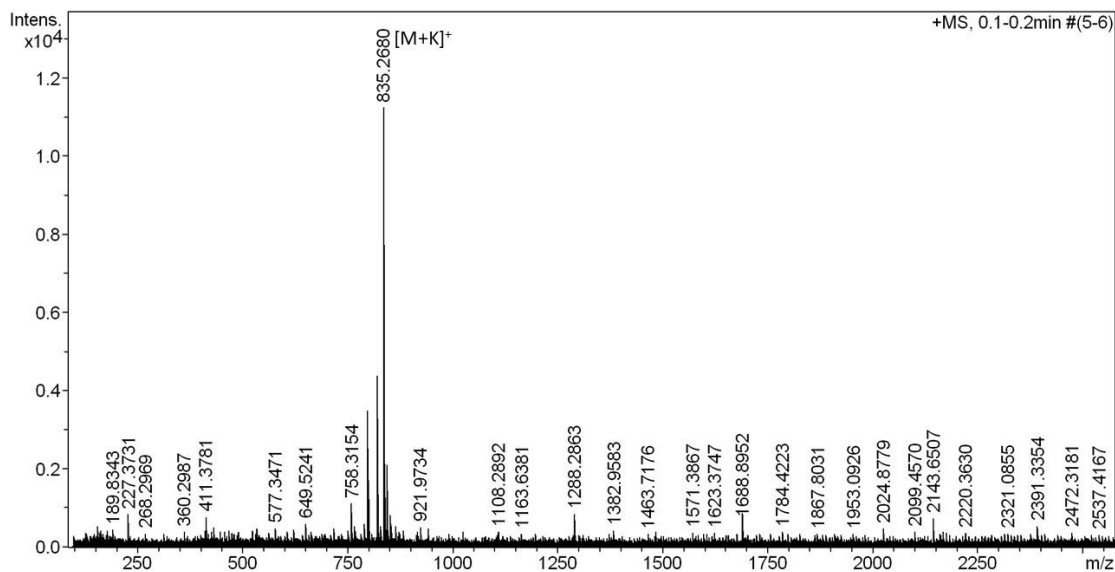
Liite 17. Lähennetty yhdisteen **13** massaspektri



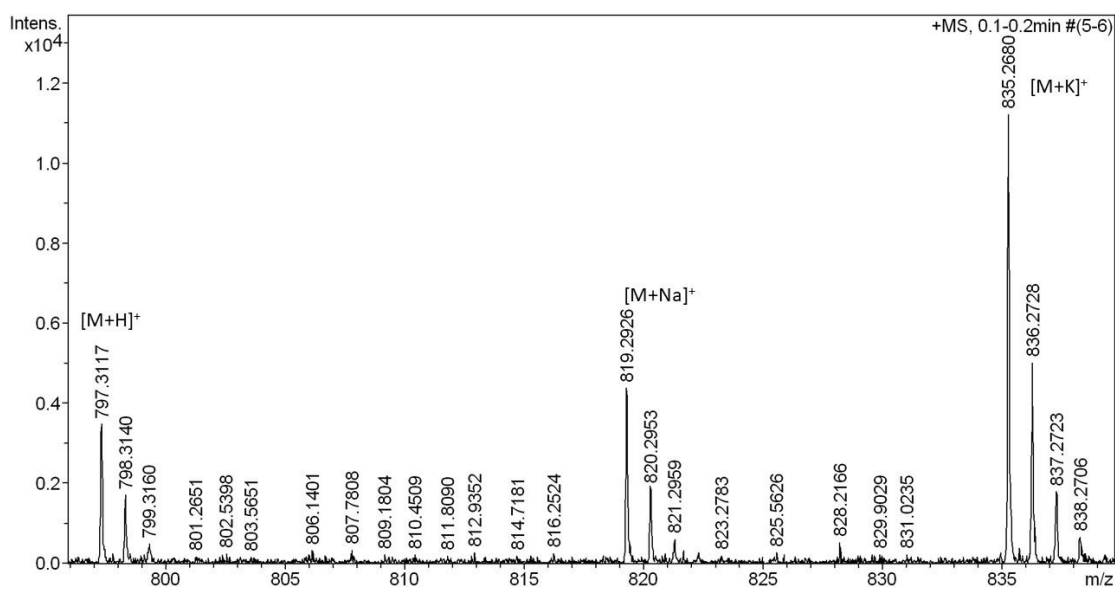
Liite 18. Monosubstituutiotuotteen (**15**) massaspektri



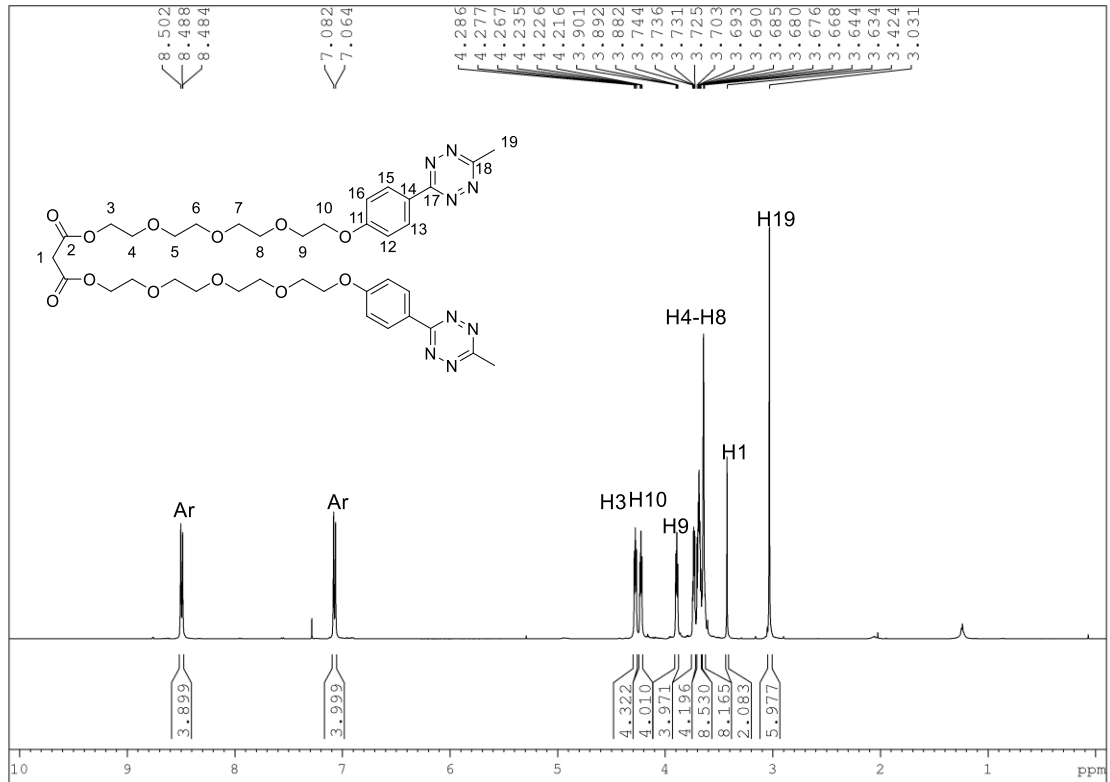
Liite 19. TEG-tetratsiinimalonaatin (19) massaspektri



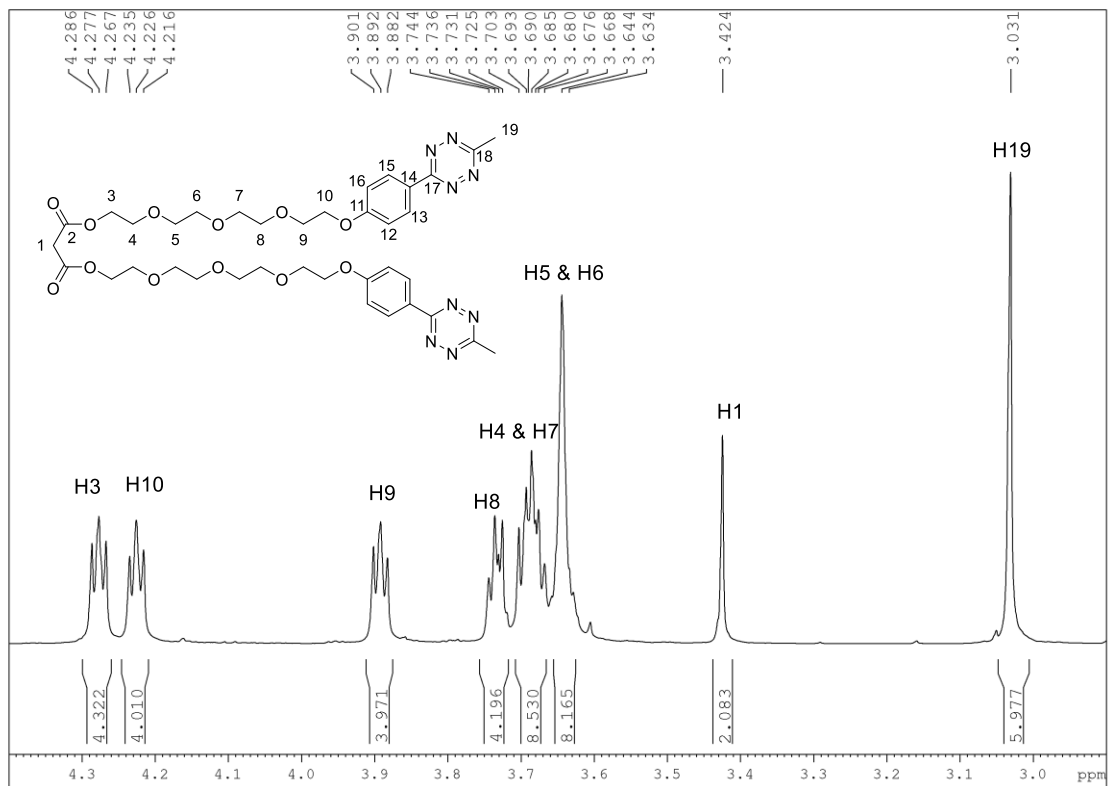
Liite 20. Lähennetty TEG-tetratsiinimalonaatin (19) massaspektri



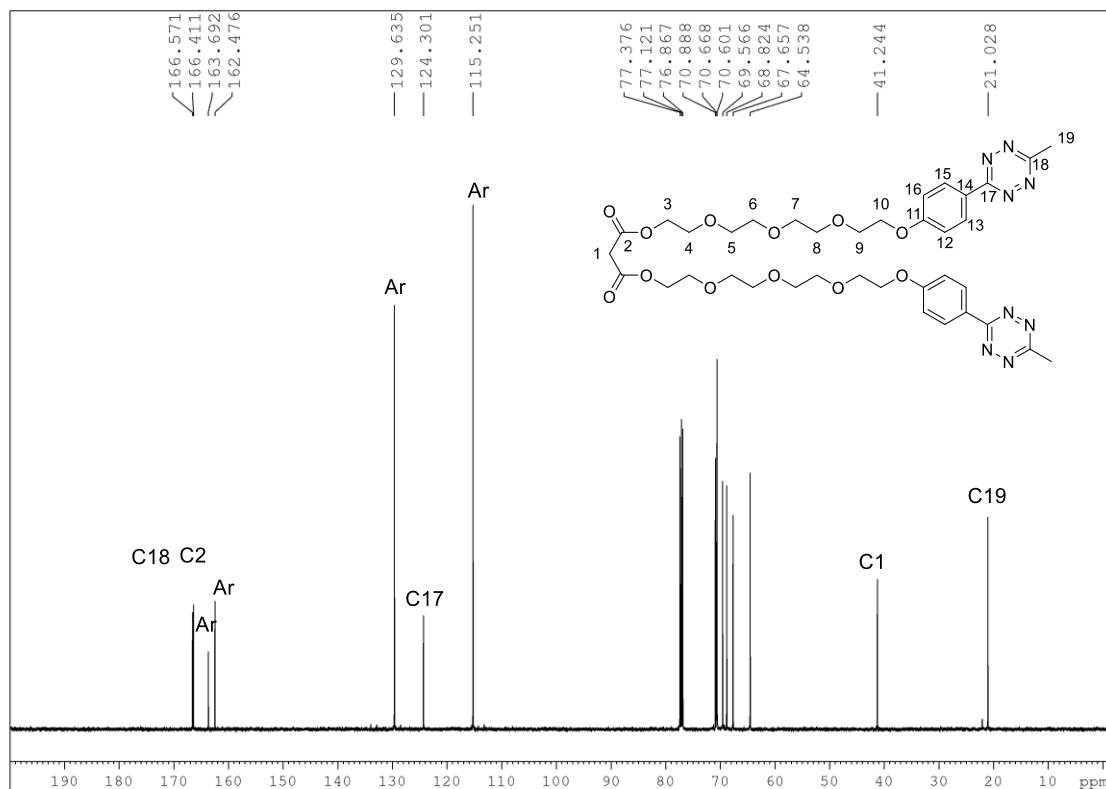
Liite 21. TEG-tetratsiinimalonaatin (19) ¹H-NMR-spektri



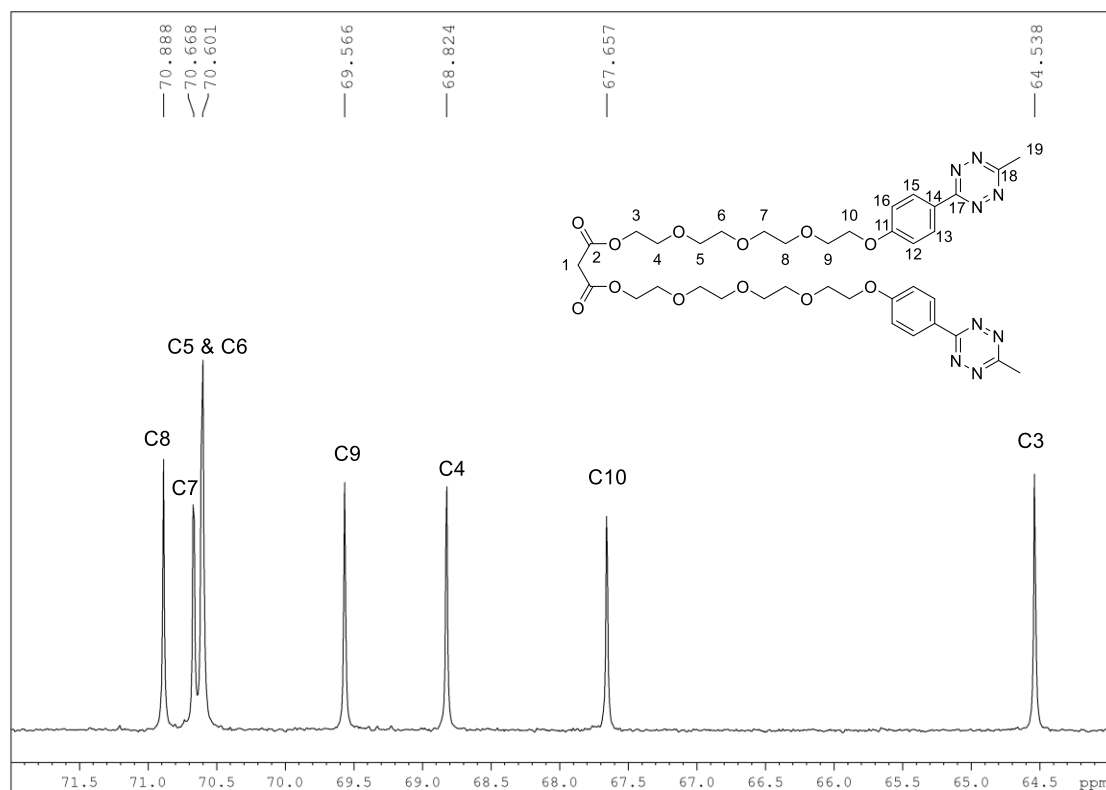
Liite 22. Lähennetty TEG-tetratsiinimalonaatin (19) ¹H-NMR-spektri



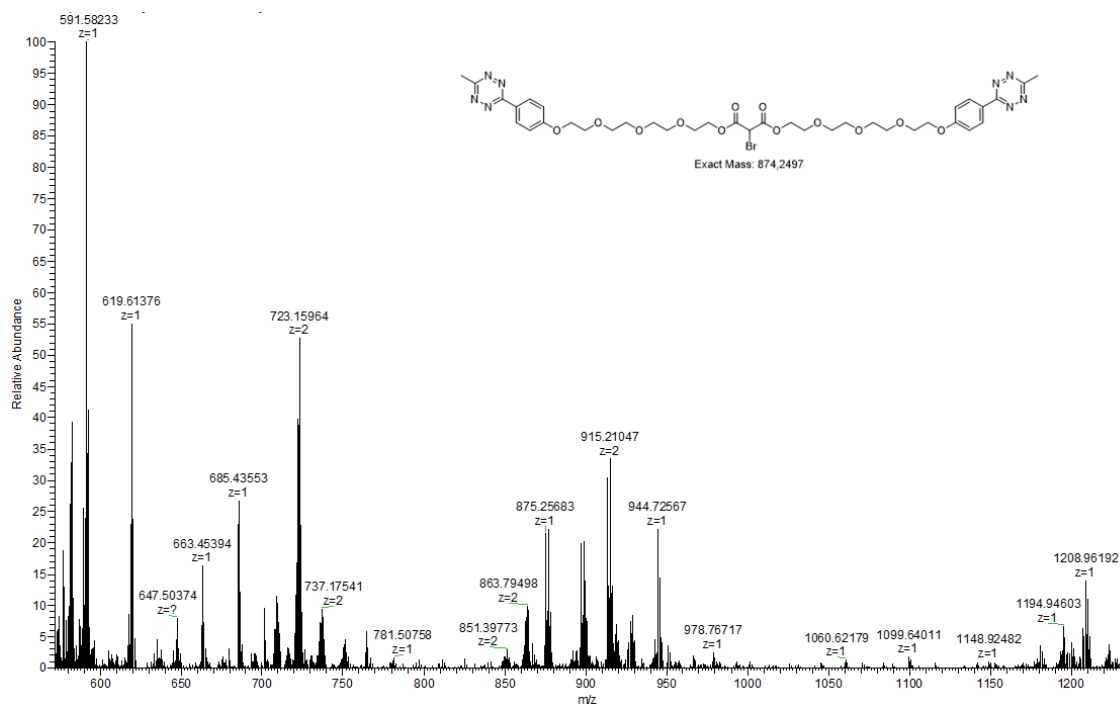
Liite 23. TEG-tetratsiinimalonaatin (19) ^{13}C -NMR-spektri



Liite 24. Lähennetty TEG-tetratsiinimalonaatin (19) ^{13}C -NMR-spektri



Liite 25. Brominoituneen tetratsiinimalonaatin massaspektri



Liite 26. Lähennetty brominoituneen tetratsiinimalonaatin massaspektri

