



**TURUN
YLIOPISTO**

siRNA-pallonukleinihappojen synteesi ja karakterisointi

Bio-organisen kemian

pro gradu -tutkielma

Aino Laasonen

25.4.2023

Turku

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

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Bio-orgaaninen kemia

Tekijä(t): Aino Laasonen

Otsikko: siRNA-pallonukleiinihappojen synteesi ja karakterisointi

Ohjaaja(t): tohtorikoulutettava Toni Laine, professori Pasi Virta

Sivumäärä: 45 sivua

Päivämäärä: 25.4.2023

Iän myötä tapahtuva silmänpohjan rappeutuminen on yksi merkittävä sokeutumiseen johtava tekijä. Silmärappeumataudin patogeneesi on tuntematon, mutta sen taustalla tiedetään olevan silmän RPE (retinal pigment epithelium) -solujen ilmentämät pro-inflammatoriset geenit. Itä-Suomen yliopistossa on tutkittu GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) -geeniä hiljentävää siRNA:ta (small interfering RNA). RPE-solumallilla tehdyistä solukokeista on saatu lupaavia tuloksia, mutta paljaat siRNA-juosteet kulkeutuivat soluihin heikosti. siRNA-juosteiden pakkaaminen pallonukleiinihapon muotoon lisää niiden solukuljetusta ja pysyvyyttä. Tämän työn tarkoitus on syntetisoida ja karakterisoida erilaisia GAPDH-siRNA:n sisältäviä pallonukleiinihappoja ja niiden kolesterolikongugaatteja sekä selvittää, miten erilaiset pallorakenteet vaikuttavat siRNA:n ominaisuuksiin.

Tässä työssä valmistettiin kolme erilaista pallonukleiinihappoa käyttäen keskusrakenteina atsidimodifioitua [C60]-fullereenia ja polyoktaedrista silseskvioksaania (POSS). Pallonukleiinihappojen valmistusta varten aminomodifioituun leimattomaan ja leimattuun sense-juosteeseen konjugoitiin bisyklononyyni (BCN) sekä antisense-juosteeseen kolesteroli. Sense-juosteet liitettiin keskusrakenteisiin rengasjännityksen tehostamalla alkyyni-atsidi-sykloadditiolla (SPAAC). Pallonukleiinihappoja hybridisoitiin antisense-juosteen ja sen kolesterolikongugaatin seoksilla. Valmiit pallonukleiinihapot karakterisoitiin PAGE:lla (poly acryl amide gel electrophoresis), SEC-MALS:illa (Size-exclusion chromatography-multiple angle light scattering), sulamislämpötilamittauksin ja DLS:llä (dynamic light scattering). Lisäksi valmistettuja pallonukleiinihappoja lähetettiin Itä-Suomen yliopistoon RPE-solumallissa tutkittaviksi.

Kaikki halutut pallonukleiinihapot onnistuttiin valmistamaan ja käytetyt menetelmät soveltuivat hyvin sekä pallonukleiinihappojen synteisiin että niiden karakterisointiin. Tehdyt solukokeet osoittivat [C60]-fullereenipallonukleiinihappojen hiljentävän GAPDH-geenin ilmennystä huomattavasti paljasta siRNA:ta paremmin. Fluoreskeiniileimaus ja kolesterolikongugaatio eivät häirinneet geenin hiljennystä. POSS-ydin näyttäisi olevan [C60]-fullereeniydintä parempi keskusrakenne. POSS-pallonukleiinihapon synteesi onnistui yhtä hyvin, ellei paremminkin, kuin [C60]-fullereenipallonukleiinihapolla. Lisäksi saatu tuote oli homogeenisempi.

Pallonukleiinihapot ovat hyvä solukuljetin silmänpohjan ikärappeumaan kohdennetulle GAPDH-siRNA:lle. Lisäksi biohajoava ja bioyhteensopiva POSS-keskusrakenne voisi olla [C60]-fullereenin ekologisesti kestävämpi korvaaja. Tulevaisuudessa pallonukleiinihappoja voitaisiin pakata solunulkoisiin vesikkeleihin solukuljetuksen parantamiseksi edelleen.

Avainsanat: atsidimuokattu [C60]-fullereeni, pallonukleiinihapot, polyoktaedrinen silseskvioksaani, silmänpohjan ikärappeuma, siRNA-terapia, terapeuttiset oligonukleotidit

Sisällysluettelo

1	Johdanto	7
1.1	Oligonukleotidit terapiamuotona	7
1.1.1	Terapeuttisten oligonukleotidien alatyypit	8
1.1.2	Terapeuttisten oligonukleotidien kliininen käyttö	9
1.1.3	Oligonukleotidi-terapioiden haasteet	12
1.2	Pallonukleiinihapot	16
1.2.1	Pallonukleiinihappojen synteesi ja erilaiset ydinrakenteet	17
1.2.2	Pallonukleiinihappojen solukuljetus reseptorivälitteisellä endosytoosilla	19
1.2.3	Pallonukleiinihappojen käyttö siRNA-terapian solukuljettimina	21
1.3	Silmänpohjan ikärappeuma kansanterveydellisenä ongelmana	22
1.3.1	Taudin yleisyys, määritelmä ja synty	22
1.3.2	Taudin hoito	24
1.3.3	Silmänpohjan ikärappeuman tulevaisuuden hoitomuodot ja RPE-solumalli	25
1.4	Työn tarkoitus	26
2	Tulokset ja niiden tarkastelu	28
2.1	RNA-juosteiden muokkaukset	31
2.2	Pallonukleiinihappojen synteetit	32
2.3	Hybridisaatiot	36
2.4	Karakterisoinnit	37
2.4.1	SEC-MALS mittaukset	37
2.4.2	Sulamislämpötila-analyysit	39
2.4.3	DLS-mittaukset	40
2.5	Solukokeiden tulokset	40
3	Materiaalit ja menetelmät	42
3.1	Yleiset menetelmät	42
3.2	Oligonukleotidit	42
3.2.1	BCN:n liittäminen sense-juosteisiin	43
3.2.2	Kolesterolin liittäminen antisense-juosteeseen	45
3.3	Monosubstituoitujen oligonukleotidi-keskusrakennekonjugaattien synteesi	45
3.3.1	Oligonukleotidi-[C60]-fullereenikonjugaatit.	45
3.3.2	Oligonukleotidi-POSS-konjugaatti	46
3.4	Pallonukleiinihappojen synteesi	46

3.4.1	[C60]-fullereenipallonukleiinihapot	46
3.4.2	POSS-pallonukleiinihappo	47
3.5	Pallonukleiinihappojen hybridisaatio	47
3.5.1	Leimallinen [C60]-fullereenipallonukleiinihappo	47
3.5.2	POSS-pallonukleiinihappo	48
3.6	Pallonukleiinihappojen karakterisointi	48
3.6.1	SEC-MALS mittaukset	48
3.6.2	Sulamislämpötila-analyysit	49
3.6.3	DLS-mittaukset	49
3.7	Solukokeet Itä-Suomen yliopistolla	50
4	Johtopäätökset ja yhteenveto	51
	Lähteet	53

Lyhenneluettelo

DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
siRNA	Small interfering RNA, pieni häiritsevä RNA
miRNA	Mikro-RNA
mRNA	Lähetti-RNA
RNAi	RNA-interferenssi
RISC	RNA induced silencing complex, RNA:n aikaan saama hiljennyskompleksi
GalNAc	<i>N</i> -asetyyliagalaktosamiini
LNA	Locked nucleic acid, lukittu nukleiinihappo
PMO	Phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide, fosforodiamidaatti– morfolino-oligonukleotidi
PNA	Peptide nucleic acid, peptidinukleiinihappo
CPP	Cell penetrating peptide, solun läpäisevä peptidi
CTP	Cell targeting peptide, soluun kohdentava peptidi
SNA	Spherical nucleic acid, pallonukleiinihappo
POSS	Polyoktaedrinen silseskvioksaani
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
VEGF	Vascular endothelial growth factor, verisuonten epiteelikasvutekijä
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glyseraldehydi-3- fosfaattidehydrogenaasi
IL-6	Interleukiini 6
RPE	Retinal pigment epithelium, verkkokalvon pigmenttiepiteeli

BCN	Bisyklononyyni
SPAAC	Strain promoted alkyne-azide cycloaddition, rengasjännityksen tehostama alkyyni–atsidi-sykloadditio
SEC-MALS	Size-exclusion chromatography–multiple angle light scattering, koonerotuskromatografia-monikulmainen valon sironta
DLS	Dynamic light scattering, dynaaminen valon sironta
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinekromatografia
PAGE	Poly acryl amide gel electrophoresis, Polyakryyliamidi geelielektroforeesi
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasetatti
ACN	Asetonitriili

1 Johdanto

1.1 Oligonukleotidit terapiamuotona

Terapeuttiset oligonukleotidit on lupaava uusi lääkeryhmä, joka voisi perinteisten pienmolekyylisten lääkkeiden ja proteiinilääkkeiden rinnalla laajentaa hoidettavissa olevien sairauksien määrää. Terapeuttisten oligonukleotidien avulla tautia aiheuttava geeni voidaan hiljentää nukleiinihappotasolla haitalliseen proteiiniin vaikuttamisen sijaan. Tämä strategia paitsi mahdollistaa aiemmin saavuttamattomissa olleiden sairauksien hoidon, antaa myös vaihtoehdon proteiineihin kohdennetulle lääkehoidolle. Proteiineihin kohdistetut lääkkeet vaikuttavat usein kohteen lisäksi muihin kuin sairautta aiheuttavaan proteiiniin, mikä johtaa haittavaikutuksiin ja odottamattomiin yhteisvaikutuksiin. (1)

Rakenteeltaan terapeuttiset oligonukleotidit ovat yksi- tai kaksijuosteisia 20–25 nukleotidin mittaisia ketjuja. Ne pariutuvat DNA:n ja RNA:n kanssa sekvenssispesifisesti Watson–Crick-emäspariutumisella. Tämän vuorovaikutuksen välityksellä terapeuttiset oligonukleotidit muokkaavat tautia aiheuttavan geenin ilmennystä. Muokkaus voi tapahtua muun muassa DNA:n transkriptiota tai RNA:n translaatiota estämällä. DNA:n transkriptiota voidaan häiritä DNA:n kaksoisjuosteen avautumista estävillä tai geenin promoottorialueelle sitoutuvilla molekyyyleillä ja RNA:n translaatiota RNA:han sitoutuvilla steerisillä esteillä tai RNA:n entsyymaattista hajotusta aktivoivilla molekyyyleillä. (2)

Kiinnostus terapeuttisten oligonukleotidien kehitykseen ja tutkimukseen heräsi, kun Zamecnik ja Stephenson julkaisivat vuonna 1978 tutkimuksensa (3), jossa he onnistuivat geenin spesifisessä hiljennyksessä synteettisellä oligonukleotidilla. Tutkimuksessaan he osoittivat, että oligonukleotidi sitoutuu spesifisesti RSV (rous sarcoma virus) -viruksen RNA:han estäen sen transkription ja siten virusten lisääntymisen soluissa. He esittivät, että löydöstä voitaisiin hyödyntää onkogeneenisten virusten lisääntymisen ehkäisyyn ja myöhemmin soveltaa myös solun omien geenien ilmennyksen kohdennettuun estämiseen. Sitten terapeuttisia oligonukleotideja on tutkittu paljon ja monta oligonukleotidia on hyväksytty myös kliiniseen käyttöön. (3)

1.1.1 Terapeuttisten oligonukleotidien alatyypit

Terapeuttisia oligonukleotideja on kehitetty useita erilaisia. Ne eroavat toisistaan esimerkiksi rakenteen ja vaikutusmekanismin perusteella. Tässä luvussa esitellään seuraavat terapeuttiset oligonukleotidit: antisense- ja antigeeni-oligonukleotidit, siRNA:t (small interfering RNA) ja miRNA:t (micro RNA) sekä ribosyymit, decoy-oligonukleotidit ja aptameerit.(1)

Antisense-oligonukleotidit ovat vanhin ja eniten tutkittu terapeuttisten oligonukleotidien luokka. Antisense-oligonukleotidit estävät translaatiota vaikuttamalla lähetti-RNA:han (mRNA). Ne sitoutuvat mRNA:han ja estävät sen translaation joko muodostamalla steerisen esteen ribosomiin sitoutumiselle tai aktivoimalla RNAasi H:n hajottamaan sitomansa mRNA:n entsyymaattisesti. RNAasi H on tärkeä endogeeninen endonukleaasi, joka hajottaa DNA/RNA-dupleksin RNA-juosteen DNA:n replikoinnissa. Sama ominaisuus saa aikaan antisense-terapian mRNA:ta hajottavan vaikutuksen. Antigeeni-oligonukleotidit ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin antisense-oligonukleotidit, mutta translaation estämisen sijaan ne estävät transkriptiota solun tumassa muodostamalla usein kolmijuosteisen kompleksin kaksijuosteisen DNA:n kanssa (1). (4)

siRNA:t ja miRNA:t vaikuttavat RNA-interferenssi (RNAi) -reaktiotien kautta. RNAi on osa solun luontaista puolustusjärjestelmää ja yksi geenin ilmennyksen säätelymekanismeista. siRNA:t ovat solujen keskeinen keino puolustautua virusinfektioilta. Solun tunnistuessa vieraan mRNA:n, se alkaa tuottaa esiaste-siRNA:ta, ja RNAi aktivoituu. Endoribonukleaasi Dicer pilkkoo solussa kaksijuosteisen esiaste-siRNA:n 21 nukleotidin pituiseksi siRNA:ksi. Valmis siRNA pakataan proteiinien ja entsyymien muodostamaan RISC (RNA-induced silencing complex) -kompleksiin. Kompleksi muuttuu aktiiviseksi, kun siRNA:n sense-juoste hajotetaan. Kun mRNA sitoutuu solussa RISC-kompleksin siRNA:n antisense-juosteeseen, kompleksi aktivoituu ja mRNA pilkkoutuu. Kun sitoutunut mRNA on hajotettu, kompleksi vapautuu hajottamaan uusia mRNA:ita. (4)

miRNA:t puolestaan säätelevät solun omien geenien ilmennystä transkription jälkeen. Solu tuottaa omien geeniensä mRNA:ta tunnistavaa kaksijuosteista esiaste-miRNA:ta, jonka Dicer pilkkoo valmiiksi miRNA:ksi. miRNA:sta muodostuu RISC-kompleksi samalla tavoin kuin siRNA:sta. Ainut ero toiminnassa on, että siRNA:han sitoutuneen vieraan mRNA:n sijaan miRNA:han sitoutunut solun oma mRNA pilkkotaan entsyymaattisesti. Solun RNAi-mekanismia voidaan hyödyntää siRNA- ja anti-miRNA-terapiassa. Synteettiset siRNA:t voidaan kohdistaa tautia aiheuttavan geenin mRNA:ta vastaan. Anti-miRNA-terapiassa puolestaan miRNA-

säätelymekanismia estetään miRNA:han sitoutuvan komplementaarisen anti-miRNA:n avulla. miRNA-säätelyn on havaittu muuttuneen useassa eri sairaudessa, kuten reumassa, virusinfektioissa ja syövässä. (4)

Antisense-oligonukleotidien sekä siRNA:n ja miRNA:n lisäksi ribotsyymit, decoy -oligonukleotidit ja aptameerit tuovat uusia mahdollisuuksia sairauksien hoitoon. Ribotsyymit ovat RNA:ita, jotka voivat toimia entsyymeinä ilman proteiiniolosuhteiden läsnäoloa. Ribotsyymit hajottavat kohde-RNA:n toimimalla katalyyttinä. Yleisin ribotsyymien kohde on mRNA, mutta niitä voidaan kohdentaa myös muihin RNA-tyyppihin. Decoy-oligonukleotidit puolestaan ovat lyhyitä kaksijuosteisia DNA ketjuja, jotka matkivat DNA:n promoottorialuetta, johon transkriptiotekijä sitoutuisi. Decoy-oligonukleotideja käytettäessä transkriptiotekijät sitoutuvat DNA:n promoottorialueen sijaan Decoy-oligonukleotidiin, ja geenin ilmennys vähenee. (1)

Aptameerit ovat vielä omanlaisensa ryhmä. Ne ovat yksijuosteisia DNA- tai RNA-juosteita, jotka laskostuvat kolmiulotteisiksi rakenteiksi. Aptameerit tunnistavat kohdemolekyylinsä niiden kolmiulotteisen rakenteen perusteella ja sitovat vahvalla affiniteetilla lukuisia eri kohdemolekyylejä. Aptameereja voidaan käyttää proteiineja sitovana lääkkeenä tai lääkekuljettimena. Aptameerit voisivat olla hyviä lääkekuljettimia, sillä ne voivat sitoutua kohdesolun pinnan reseptoreihin ja niihin voidaan pakata lääkemolekyylejä kuljettaviksi. (1)

1.1.2 Terapeuttisten oligonukleotidien kliininen käyttö

Ensimmäisen kliiniseen käyttöön hyväksytyyn terapeuttiseen oligonukleotidin, Vitravenen, jälkeen maailmanlaajuisesti on hyväksytty 16 muuta RNA-pohjaista terapeuttista oligonukleotidia. Terapeuttisten oligonukleotidien kliinisiä kokeita oli käynnissä marraskuussa 2021 yhteensä 222 kpl. Hyväksytyt terapiat ovat olleet mRNA:ta, antisense-oligonukleotideja, siRNA:ta tai aptameereja. Hyväksytyjä oligonukleotideja on käytetty geneettisten, fysiologisten ja infektiosairauksien hoidossa. Hyväksytyistä hoidoista 12 on luokiteltu ns. orvoiksi lääkkeiksi (engl. orphan drugs) eli ovat hoitoja harvinaisiin sairauksiin, joihin ei ole vielä ollut olemassa hoitomuotoa. (5)

Hyväksytyistä terapeuttisista oligonukleotideista suurin osa on antisense-oligonukleotideja. Ensimmäinen hyväksytty terapeuttinen oligonukleotidi oli Vitravenen (fomivirsen) (6) sytomegaloviruksen (CMV, cytomegalovirus) aiheuttaman silmän retinan tulehduksen hoitoon. Vitravenen lisäksi on hyväksytty 9 muuta antisense-oligonukleotidia, jotka kaikki on kohdennettu jonkin harvinaisen perinnöllisen sairauden hoitoon. Kynamro (mipomersen) (7)

hyväksyttiin vuonna 2013 hyperkolesterolemian ja Spinraza (nusinersen) (8) vuonna 2016 spinaalisen lihasatropian hoitoon. Duschennen lihasatropian hoitoon on hyväksytty vuosina 2016–2018 neljä antisense-oligonukleotidia: Exonzys 51 (eteplirsen) (9), Vyondys 53 (golodirsen) (10), Viltepsa (viltolarsen) (11) ja Amondys 45 (casimersen) (12). (5)

Muita hyväksytyjä antisense-oligonukleotideja ovat vuonna 2018 hyväksytyt Tegsedil (inotersen) (13) monielinvauriota aiheuttavan transtyretiinivälitteiseen amyloidoosiin ja Milasen (14) yksittäisen potilaan Battenin taudin hoitoon. Lisäksi vuonna 2019 hyväksyttiin Waylivra (volanesorsen) (15) ravinnon rasvojen hajotusta heikentävän familiaalisen kylomikronemian hoitoon. (5)

Kaikki neljä hyväksyttyä siRNA-terapiaa on hyväksytty vuoden 2018 jälkeen. siRNA-terapioiden kohteet olivat kaikki geneettisiä sairauksia ja osittain samoja kuin antisense-oligonukleotideilla. Onpattro (patisiran) (16) hyväksyttiin monielinvauriota aiheuttavaan transtyretiinivälitteiseen amyloidoosiin vuonna 2018 ja Givlaari (givosiran) (17) hemin puutosta aiheuttavan akuutin maksan porfyrian hoitoon vuonna 2019. Vuonna 2020 hyväksyttiin kaksi siRNA-terapiaa: Oxlumo (lumasiran) (18) munuaisvaurioita aiheuttavan tyypin 1 primäärisen hyperoksalurian ja Leqvio (inclisiran) (19) korkean kolesterolin hoitoon. (5)

Hyväksytyistä RNA-terapiosta kaksi, koronarokotteet Comirnaty ja Spikevax, on mRNA-pohjaisia. Rokotteiden teho perustuu mRNA:sta kehossa tuotettujen viruspiikkiproteiinien aiheuttamaan immuunivasteeseen (20). Aptameereja puolestaan on tähän mennessä hyväksytty vain yksi, Macugen (pegaptanibi) (21). Macugen estää verisuonten uudismuodostusta nesteisessä silmänpohjan ikärappeumassa. (5)

Koronaviruspandemia näkyi marraskuun lopussa 2021 käynnissä olleissa RNA-terapioiden kliinisissä kokeissa. Kokeista 53 % keskittyi mRNA-terapioihin. Seuraavaksi suurimmat ryhmät olivat siRNA-terapiat 24 %:n ja antisense-oligonukleotidit 20 %:n osuudella kliinisistä tutkimuksista. Kliinisissä kokeissa on paljon lupaavia ja uusia kandidaatteja, sillä 30 % käynnissä olleista kokeista oli faasien 3 tai 4 tutkimuksia ja uusien ennen hyväksymättömien RNA-molekyylien osuus tutkittavista molekyyleistä oli 52 %. Tutkittavista RNA-molekyyleistä lähes puolet oli suunniteltu infektioitauteihin, mitä selittää käynnissä olleiden koronarokotetutkimusten suuri määrä. Kun koronarokotteita ei oteta huomioon, tutkittavista RNA-molekyyleistä 40 % oli geneettisten sairauksien, 23 % syöpien ja 19 % fysiologisten sairauksien hoitoon. (5)

Geneettisistä sairauksista erityisesti hormoneja erittävien elinten sairauksia voidaan hoitaa mRNA-terapialla. mRNA-terapiaa voidaan hyödyntää kahdella tavalla: proteiinin ilmennyksen palauttamiseksi normaalitasolle tai korvaamaan virheellisen proteiinin tuotantoa. Antisense-oligonukleotideja voidaan käyttää taudinaiheuttajageenien hiljentämiseen geneettisten silmä- ja hermostosairauksien hoidossa. Esimerkiksi perinnöllisiä silmän retinan sairauksia aiheuttavia mutaatioita kohtaan on kehitetty erilaisia silmukointia muokkaavia tai geenin ilmennystä hiljentäviä antisense-oligonukleotideja (22). Lisäksi siRNA-terapiaa tutkitaan geneettisten sairauksien, kuten hormoneja erittävien elinten ja hermoston sairauksien hoidossa. Aptameereilla on käynnissä myös kokeita, joissa etsitään hoitoa geneettisiin veren hyytymisen häiriöitä aiheuttaviin sairauksiin.(5)

Syöpien hoidossa tutkituista mRNA:ista valtaosa on syöpärokotteita. Syöpärokotteilla voidaan ehkäistä syöpiä estämällä syöpää aiheuttavia virusinfektioita, kuten HPV (human papilloma virus) -infektioita. Syöpärokotteiden lisäksi mRNA:ta voidaan käyttää immuno-onkologisena hoitona, jossa immuunipuolustuksen tunnistamia proteiineja tuottamalla tehostetaan immuunipuolustuksen reaktioita syöpäsoluja vastaan. Antisense-oligonukleotideja voidaan käyttää syöpää aiheuttavien geenien ja syövän etenemistä edesauttavien geenien hiljentämiseen. Syöpään kohdennetuilla siRNA-terapioidella pyritään myös hiljentämään tietyssä syöpätyypissä yli-ilmennettyjä geenejä. Lisäksi käynnissä on yksi miRNA:ta matkivan molekyylin tutkimus. Tutkittava miRNA voisi aiheuttaa syöpäsolujen solusyklin häiriöitä ja apoptoosia.(5)

Fysiologisten sairauksien hoidossa antisense-oligonukleotideja tutkitaan keskushermoston sairauksissa ja lipidiaineenvaihdunnan häiriöissä. siRNA-terapiaa puolestaan on tutkittu lukuisissa sydän- ja verisuonielimistön sekä maksan sairauksissa. Esimerkiksi lipidiaineenvaihdunnan säätelyyn osallistuvien geenien ilmennyksen hiljentämiseen on löydetty jo useita antisense-oligonukleotideja ja siRNA:ita. *N*-asetyyligalaktosamiiniin (GalNAc) konjugoituna ne kulkeutuvat hyvin kohdekudoksensa maksan hepatosyytteihin (23). Lisäksi tutkimuksissa on lääkkeitä ei-geneettisen korkean verenpaineen sekä ei-alkoholin aiheuttamien rasvamaksan ja sitä seuraavan maksatulehduksen hoitoon.(5)

1.1.3 Oligonukleotidi-terapioiden haasteet

Oligonukleotidi-terapiat ovat lupaavia hoitoja moneen erilaiseen sairauteen. Terapeuttisia oligonukleotideja on tutkittu paljon ja moni niistä on hyväksytty kliiniseen käyttöön. Siitä huolimatta niiden käyttöön liittyy yhä haasteita, jotka vaikuttavat hoidon tehoon. Kolme suurinta haastetta ovat huono pysyvyys soluissa ja niiden ulkopuolella, heikko kuljetusteho kohdesoluun ja -kudokseen sekä mahdolliset *off-target*-vaikutukset ja immunostimulaatio (4).

Systeemisesti annosteltaessa oligonukleotidit kohtaavat monta estettä ennen pääsyä solunsisäiseen kohteeseensa. Verenkierrossa nukleaasit hajottavat oligonukleotidit nopeasti, oligonukleotideja eritetään munuaisten kautta virtsaan sekä veren monosyytit ottavat sisäänsä ja hajottavat vierasta geneettistä materiaalia. Jos oligonukleotidi säilyy verenkierrossa ehjänä tarpeeksi pitkään, sen on poistuttava verenkierrosta verisuonen endoteelin läpi ja diffundoiduttava soluväliaineessa kohdesolun luo. Kudosväliaineessa oligonukleotidit on alttiita kudismakrofagien hyökkäykselle. Lopuksi oligonukleotidin on siirryttävä solukalvon läpi soluun ja vapauduttava endosomista ennen kuin se pääsee vaikuttamaan kohteeseensa solulimassa tai solun tumassa. (24)

Oligonukleotidien huono pysyvyys vaikuttaa oligonukleotidi-terapioiden tehoon huomattavasti. Nukleiinihapot, erityisesti RNA:t, hajotetaan soluissa nopeasti. Nopea hajotus siten lyhentää antisense-oligonukleotidien, siRNA-terapian ja anti-miRNA:iden vaikutusaikaa kohdesolussa sekä hankaloittaa niiden systeemistä annostelua. Pysyvyyden haasteet pystytään kuitenkin jo aika hyvin ratkaisemaan tuottamalla kemiallisesti muokattuja terapeuttisia oligonukleotideja. Kemiallisissa muokkauksissa juosteen sekvenssi säilyy samana, mutta sen muu rakenne muuttuu nukleaaseille haastavammaksi tunnistaa. Pysyvyyden lisäksi kemiallisilla muokkauksilla voidaan kasvattaa oligonukleotidin affiniteettia kohteeseensa ja vähentää oligonukleotidin aiheuttamia immunologisia vasteita. (4)

Oligonukleotidien kemiallisia muokkauksia on monenlaisia. Usein oligonukleotidit jaetaan ensimmäisen, toisen ja kolmannen polven oligonukleotideihin niiden sisältämien kemiallisten muokkausten tyyppin mukaan. Ensimmäisen polven oligonukleotideissa nukleotidienväliset fosfodiesterisidokset on vaihdettu pysyvämpiin rakenteisiin. Toisen polven oligonukleotideissa taas muokataan nukleosidien sokeriosaa vaihtamalla sen substituentteja. Ensimmäisen ja toisen polven muokkauksia on mahdollista myös yhdistellä parhaiden ominaisuuksien aikaan saamiseksi. Kolmannen polven oligonukleotideissa muokkaukset ovat kokonaisvaltaisempia ja voivat kohdistua useampaan oligonukleotidin osaan samanaikaisesti. (1)

Koska nukleaaetit tunnistavat ja katkaisevat oligonukleotidienvälisen fosfodiesterisidoksen herkästi, oli se ensimmäinen kohde oligonukleotidien kemiallisille muokkauksille. Ensimmäinen ja yhä laajimmin käytössä oleva sidosmuokkaus on fosforotioaatti-muokkaus. Siinä fosfodiesterisidokseen osallistuvan fosfaattiryhmän ei-sitoutuva happi on vaihdettu rikiksi. Vaihdos kasvattaa oligonukleotidin pysyvyyttä endo- ja eksonukleaaseja vastaan. Lisäksi sen on havaittu parantavan kohdesoluun pääsevän oligonukleotidin osuutta huomattavasti. Fosforotioaatti-oligonukleotideilla on korkeampi affiniteetti plasman proteiineihin, jolloin oligonukleotidin erityis munuaisten kautta vähenee. Lisäksi rakenne lisää soluun ottoa sitoutumalla solun pinnan reseptoreihin. Muokkaus ei häiritse RNAasi H:n tunnistusta ja siksi se soveltuu hyvin käytettäväksi antisense-oligonukleotideilla. Fosforotioaatti-muokkaus lisää myös kaksijuosteisen siRNA:n pysyvyyttä siRNA:n aktiivisen sekvenssin reunaosissa käytettäessä. (2)

Huolimatta saavutetuista eduista fosforotioaatti-muokkauksella on myös heikkous: sen käyttö saattaa vähentää antisense-oligonukleotidin affiniteettiä kohde-mRNA:han. Haittavaikutus voidaan kiertää valmistamalla gap-meereja eli oligonukleotideja, jossa aktiivisen sekvenssin kumpaankin päähän kiinnitetään stabiiliutta lisäävät fosforotioaatti-muokatut siivekkeet. Lisäksi muita fosfodiesterisidoksen muokkauksia, kuten boraanifosfaatti- ja metyylifosfaatti-muokkauksia, on tutkittu. (2)

Ensimmäisen polven fosfodiesterisidoksen muokkausten puutteita voidaan täydentää nukleosidin sokeriosaan keskittyvillä toisen polven muokkauksilla. Sokeriosaa muokkaamalla sen konformaatio saadaan muotoon, joka lisää oligonukleotidin affiniteettiä kohteeseensa ja parantaa oligonukleotidin pysyvyyttä. Pysyvyyden kasvu perustuu RNA:n pilkkoutumisen mekanismeissa keskeisen 2'-OH-ryhmän puuttumiseen. Haluttu konformaatio saadaan aikaan hyödyntämällä steerisiä esteitä tai anomeerisia vaikutuksia. 2'-O-Me on yleisin käytössä oleva nukleosidianalogi. 2'-O-Me-analogin pysyvyys ja affiniteetti kohteeseensa ovat huomattavasti muokkaamatonta oligonukleotidia suuremmat. Kuten muutkin 2'-O-modifikaatiot, 2'-O-Me häiritsee RNAasi H:n toimintaa. Tämän vuoksi antisense-oligonukleotideilla käytetään ns. gap-meeri -strategiaa, jossa modifikaatiot sijoitetaan juosteen päihin (siipiosiin), keskiosan (ikkuna) koostuessa 2'-deoksinukleotideista. Myös RNA-interferenssi on herkkä modifikaatioille. siRNA:n terminaaliosat sallivat modifikaatioita paremmin, mutta modifikaatioiden vaikutus on vaikeammin ennustettavissa kuin RNAasi H:ta aktivoivissa antisense-oligonukleotideissa. Toinen paljon käytetty analogi on 2'-F. Sen rakenne on hyvin lähellä luonnollista RNA:ta, minkä takia sillä on matala toksisuus ja sitä voidaan hyödyntää monessa erilaisessa

terapeuttisessa oligonukleotidissa. 2'-O-Me-analogin tavoin myös 2'-F lisää affiniteettia ja pysyvyyttä, mutta toisin kuin 2'-O-Me, se lisää pysyvyyttä vain endonukleaaseja vastaan. (4)

Kolmannen polven oligonukleotideista yleisimpiä ovat LNA:t (locked nucleic acid), PMO:t (phosphordiamidate morpholino oligonucleotide) ja PNA:t (peptide nucleic acid). LNA:issa nukleosidin riboosin 2'-hapon ja 4'-hiilen välillä on metyleenisilta, joka lukitsee nukleosidin C3-endo- eli N-muotoon. LNA:t lisäävät pysyvyyttä nukleaaseja vastaan ja parantavat oligonukleotidin affiniteettia hybridisoituun juosteeseen. PMO:issa nukleosidien riboosi on korvattu morfolino-renkaalla ja nukleotidienväliset fosfodiesterisidokset fosforodiamidaattisidoksilla. PMO-muokkaus on hyödyllinen geenin ilmennyksen steerisissä estäjissä, sillä se tarjoaa hyvän pysyvyyden nukleaaseja vastaan, mutta säilyttää juosteen affiniteetin kohteeseen. PNA:issa fosfodiesterisidokset on korvattu pseudopeptidiketjulla, jossa nukleosidit kiinnittyvät metyleenikarbonyylilinkkauksella N-(2-amino-etyyli)-glysiinin muodostamaan polymeeriketjuun. PNA:t vastustavat hyvin nukleaasihajotusta ja niillä on korkeampi affiniteetti kohde-RNA:han kuin muokkaamattomilla oligonukleotideilla. Mikään edellä mainituista kolmannen polven oligonukleotideista ei aktivoi RNAasi H:ta. Siksi antisense-oligonukleotideja muokattaessa kolmannen polven oligonukleotideilla on käytettävä gap-meeri-strategiaa. (1)

Huomattavasti pysyvyyttä suurempi haaste oligonukleotidi-terapiaille on paljaiden oligonukleotidien heikko kuljetus kohdekudokseen ja erityisesti kohdesoluun. Oligonukleotidit kuljetetaan soluun pääasiassa reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Siksi olisikin tärkeää, että oligonukleotidi aktivoisi endosytoosia ja pystyisi vapautumaan endosomista päästyään solun sisälle. Ratkaisuksi heikkoon soluun ottoon on kehitetty kaksi strategiaa, joilla soluun ottoa voidaan tehostaa: oligonukleotidiin voidaan konjugoida solukuljetusta edesauttava molekyyli tai oligonukleotidi voidaan pakata solukuljettimeen. (4)

Konjugointimenetelmässä oligonukleotidin 5' tai 3'-päähen liitetään kovalenttisesti peptidi, lipidi, hiilihydraatti tai pienmolekyyli, joka sitoutuu spesifisesti kohdesolun pinnan reseptoriin. Hiilihydraatit ovat käynnissä olevissa terapeuttisten oligonukleotidien kliinisissä kokeissa eniten käytetty konjugaatti. Kolmesta GalNAc-yksiköstä koostuva konjugaatti sitoutuu maksan hepatosyyttien asialoglykoproteiini-reseptoriin korkealla affiniteetilla ja se otetaan soluun nopeasti. Kolesteroli puolestaan on eniten käytetty lipidikonjugaatti. Kolesteroli-oligonukleotidi sitoutuu veren lipoproteiineihin ja se kuljetetaan niiden mukana aktiivisella soluun otolla maksasoluihin. Oligonukleotideja voidaan konjugoida myös pienimolekyyliisiin

reseptoreja targetoiviin lääkemolekyyleihin tai ligandeihin, kuten folaattiin. Konjugaatteina käytettyjä peptideitä puolestaan on kaksi erilaista: solun läpäisevät (cell penetrating peptides, CPP) ja soluihin kohdistavat (cell targeting peptides, CTP) peptidit. CPP:t voivat kulkea solukalvon läpi ja kuljettaa mukanaan oligonukleotideja. CTP:t taas ovat ligandeja, jotka kohdistuvat jossakin sairaudessa yli-ilmennettyyn reseptoriin ja voivat siten ohjata oligonukleotidin kohdesoluun. (25)

Konjugaattien sijaan soluun ottoa voidaan parantaa myös solukuljettimilla. Solukuljettimet sulkevat oligonukleotidit sisäänsä ja aktivoivat spesifisesti kohdesolun solukuljetusta. Ne siis suojaavat oligonukleotideja hajotukselta ja lisäävät oligonukleotidien kuljetusta kohdesoluun. Solukuljettimina on käytetty muun muassa liposomeja, nanopartikkeleita, dendrimeerejä ja hiilinanoputkia (engl. carbon nanotubes). Liposomit (26) ovat laajasti käytettyjä ja ei-toksisia solukuljettimia. Ne koostuvat fosfolipidikaksoiskalvosta, minkä ansiosta niiden hydrofiiliseen sisustaan voidaan pakata hydrofiilisiä oligonukleotideja, jotka kuljetetaan soluun liposomin hydrofobisen ulkopinnan avulla. Liposomit suojaavat oligonukleotideja ja ovat biologisesti inertejä. Siksi niitä pidetäänkin optimaalisena kuljettimena oligonukleotideille. (26)

Nanopartikkelit ovat partikkelisia seoksia tai kiinteitä partikkeleita, jotka mahdollistavat labiilien ja heikkoliukoisten lääkemolekyylien kuljetuksen. Ne voivat suojata oligonukleotideja hajotukselta ja estää monosyyttien tunnistuksen. Nanopartikkelien etu on myös se, että ne voivat kulkeutua syöpäkasvaimiin kasvainten vuotavien verisuonten seinämien läpi. Dendrimeerit taas ovat synteettisiä, haarautuneita ja pallomaisia makromolekyylejä, joilla on kolmiulotteinen nanokokoinen rakenne. Dendrimeerit välttävät veren monosyyttien tunnistusta ja tehostavat solunsisäistä kuljetusta. Dendrimeerejä on käytetty pieneimolekyylisten lääkkeiden solukuljettimina, mutta oligonukleotidien kuljetuksessa niitä on tutkittu vielä vähän. (26)

Hiilinanoputket ovat kiinnostava uusi kuljetinpartikkelien ryhmä. Ne ovat grafiittihilasta muodostuneita yksiulotteisia nanorakenteita. Hiilinanoputket kiinnostavat solukuljettimina, koska ne käyttävät ns. nanoneulamenetelmää, jolla ne kulkevat soluun solukalvon läpi endosytoosisista riippumatta, eivätkä aiheuta solukuolemaa. Lisäksi hiilinanoputket pystyvät sitoutumaan erilaisiin makromolekyyleihin, kuten DNA:han ja proteiineihin. Kaikkien esiteltyjen solukuljettimien tehoa ja kohdespesifisyyttä voidaan parantaa entisestään konjugoimalla niiden pintaan jonkin kohdesolun reseptoriin sitoutuva ligandi. (26)

Pysyvyyden ja solukuljetuksen lisäksi mahdolliset haittavaikutukset, esimerkiksi *off-target*-vaikutukset tai immunostimulaatio, ovat myös oligonukleotiditerapiaan liittyviä haasteita. Muiden kuin kohdegeenien hiljennys eli ns. *off-target*-vaikutukset liittyvät sekä antisense-oligonukleotidi- että siRNA-terapiaan, joskin ne ovat yleisempiä siRNA-terapiassa. Toisinaan antisense-oligonukleotidien ja siRNA:iden osittainen komplementaarisuus muiden kuin kohde-mRNA:n kanssa voi johtaa geenin hiljentämiseen. Oligonukleotidi-terapioiden selektiivisyyttä voidaan kuitenkin parantaa käytetyn sekvenssin tarkalla valinnalla ja oligonukleotidin kemiallisilla modifikaatioilla. (4)

Immunostimulaatio on toinen oligonukleotidi-terapian mahdollinen haittavaikutus. Lähtökohtaisesti immunostimulaatiota tulisi välttää, ellei se ole juuri lääkkeen haluttu vaikutus. Immuunivasteen aktivoituminen voi paitsi vääristää tutkimustuloksia, myös aiheuttaa potilaalle vakavan haittavaikutuksen (4). Vieras yksi- ja kaksijuosteinen RNA on kehossa merkki virusinfektiosta ja niiden tunnistus saa aikaan synnynnäisen immuunipuolustuksen aktivoitumisen. Solut puolustavat itseään välttämällä geneettisen materiaalin soluun ottoa. Solujen pinnalla ja solunsisäisissä vesikkeleissä, kuten endo- ja lysosomeissa, on reseptoreita, jotka tunnistavat RNA:ta sekvenssin ja muodon perusteella. Riboosiosokeriosa ja uridiiniyksiköt erottavat RNA:n DNA:sta ja lisäävät RNA:n tunnistusta. Riboosiosan kemialliset muokkaukset ja urasiiliemästen korvaaminen 5-metyyliurasiililla (= tymiini ja ko. nukleosidi = ribotymidiini) vähentävät terapeuttisten RNA:iden aiheuttamaa immunostimulaatiota. Lisäksi endosomeja välttävän solukuljetuksen valinta vähentää todennäköisyyttä immuunivasteen aktivoitumiseen. (27)

1.2 Pallonukleiinihapot

Pallonukleiinihapot (spherical nucleic acids, SNA) ovat nanorakenteita, jotka koostuvat ydinpartikkelista ja siihen konjugoitujen oligonukleotidien muodostamasta tiivistä ja järjestelmällisestä kuoresta. Pallonukleiinihappoilla on monia edullisia ominaisuuksia niiden lineaarisiin vastineisiin verrattuna. Ne sitovat vastinjuostetta korkeammalla affiniteetilla, vastustavat nukleaasien hajotusta, eivät aktivoi synnynnäistä immuunipuolustusta ja kulkeutuvat nopeasti soluihin scavenger-reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Näiden ominaisuuksien vuoksi pallonukleiinihappoja voidaan hyödyntää esimerkiksi DNA:n ja RNA:n detektoinnissa *in vitro*, geenien ilmennyksen säätelyssä ja syövän kemoterapiassa. (28)

Pallonukleiinihapot mainitaan kirjallisuudessa ensimmäisen kerran Mirkinin ym. vuonna 1996 julkaistussa artikkelissa (29), jossa he käyttivät oligonukleotideja kultananopartikkelien liittämiseen toisiinsa. Aluksi Mirkin ym. kiinnittivät oligonukleotidit kultananopartikkeliin, eli loivat ensimmäiset pallonukleiinihapot, ja aggregoivat pallonukleiinihappoja toisiinsa komplementaarisen DNA-juosteen avulla (29). Myöhemmässä tutkimuksessaan Mirkin ym. kokeilivat oligonukleotidimuokattujen kultananopartikkelien käyttöä geenin ilmennyksen säätelyssä, sillä he olivat aiemmin havainneet rakenteen lisäävän oligonukleotidien pysyvyyttä ja parantavan niiden sitoutumisominaisuuksia (30). Tutkimuksessa Mirkin ym. osoittivat, että antisense-oligonukleotidi-kultananopartikkelikompleksi otetaan soluun 99 % paljasta antisense-oligonukleotidia paremmin. Lisäksi EGFP (enhanced green fluorescent protein) -geenin ilmennyksen hiljennys oli huomattavasti tehokkaampaa kuin transfektioreagenssilla kuljetettulla paljaalla antisense-oligonukleotidilla (30).

Ensimmäisten tutkimusten jälkeen useat tutkijat ovat tutkineet ja käyttäneet pallonukleiinihappoja monessa tärkeässä, ja toisinaan myös kaupallisesti kannattavassa, käyttötarkoituksessa (31). Niiden käyttöä bioteknologiassa ja diagnostiikassa on tutkittu paljon. Pallonukleiinihappojen avulla voidaan tunnistaa shiga-toksiinia tuottavia *E.coli* -bakteerikantoja elintarvikkeista (32) ja diagnosoida sydänlihaksen hapenpuutteesta johtuva sydäninfarkti käytössä olevia menetelmiä varhaisemmin (33). Pallonukleiinihappoja on tutkittu myös spesifisinä lääkekuljettimena mm. konjugoimalla syöpälääke paklitakselia, vasta-ainetta ja tuumorinekroositekijää (tumor necrosis factor, TNF) kultananopartikkelin pinnalle (34). Lisäksi niitä on voidaan käyttää siRNA-terapian solukuljettimena ihosyövissä ja geneettisissä ihosairauksissa aktiivisen endoteelin kasvutekijäreseptorin (endothelial growth factor receptor, EGFR) ilmennyksen hiljentämiseksi paikallisesti annosteltaessa (35).

1.2.1 Pallonukleiinihappojen synteesi ja erilaiset ydinrakenteet

Pallonukleiinihapoista voidaan valmistaa lukuisia erilaisia kemiallisia variaatioita, mikä mahdollistaa niiden monipuoliset käyttökohteet. Pallonukleiinihapoissa käytetyt oligonukleotidit voivat olla joko RNA:ta tai DNA:ta ja yksi- tai kaksijuosteisia. Oligonukleotideista voidaan tunnistaa kolme tärkeää aluetta: ytimeen kiinnittymisen mahdollistava osa, toiminnallinen tunnistusosa ja nämä kaksi osaa yhdistävä osa. Diagnostiikassa oligonukleotidin toiminnallinen tunnistusosa jätetään yksijuosteiseksi ja se sitoutuu etsittyyn nukleiinihapposekvenssiin, kun taas siRNA-terapiassa toiminnalliseen tunnistusosaan on hybridisoitu sense-juoste. Oligonukleotidin eri alueita muokkaamalla

voidaan vaikuttaa valmistetun pallonukleiinihapon ominaisuuksiin. Esimerkiksi toiminnallisen osan kemiallisilla muokkauksilla voidaan lisätä geenin hiljennyksen tehoa tai oligonukleotidin päähän voidaan liittää jokin leima jatkotutkimusten helpottamiseksi. (31)

Oligonukleotidin lisäksi myös ydinrakenteen valinta vaikuttaa pallonukleiinihappojen ominaisuuksiin. Eri ydinrakenteet sitovat eri määrän oligonukleotideja, jolloin oligonukleotiditiheydessä on eroja. Lisäksi eri ytimet vaativat omanlaisensa reaktio-olosuhteet oligonukleotidien kiinnittämiseksi keskusrakenteeseen. Ensimmäiset pallonukleiinihapot valmistettiin kultananopartikkeleista, mutta niiden synteesissä on käytetty myös lukuisia muita epäorgaanisia ja orgaanisia keskusrakenteita. (31)

Epäorgaanisia keskusrakenteita ovat muun muassa hopea, kvanttipisteet (engl. quantum dots), rautaoksidi ja piidioksidi sekä orgaanisia esimerkiksi liposomit, polymeerit ja proteiinit (28). Hopeananopartikkelit ovat keskusrakenteina hyvin kultananopartikkelien kaltaisia (36). Kvanttipisteiden käyttö puolestaan tarjoaa uusia mahdollisuuksia materiaalikemialle muun muassa rakenteen sähköisten ja luminesenssiominaisuuksien vuoksi (37). Kuparikatalysoitua atsidi-alkyyini-napsautuskemiaa käytettiin oligonukleotidien kiinnityksessä ydinrakenteeseen ensimmäisen kerran rautaoksiditytimillä (38). Piidioksididin poikkeaa muista esitellyistä epäorgaanisista ytimistä paljon, sillä se on bioyhteensopiva ja onttu (39). Piidioksidipallonukleiinihapon valmistuksessa kultananopartikkeli päällystetään piidioksidilla, oligonukleotidit kiinnitetään piidioksidikuoreen ja lopuksi kultananopartikkeli poistetaan rakenteen keskeltä jodilla oksidatiivisella liuotuksella (engl. oxidative dissolution) (39).

Liposomit mahdollistavat metallittomien pallonukleiinihappojen valmistamisen. Liposomipallonukleiinihappoissa oligonukleotidit kiinnittyvät tokoferolin välityksellä liposomin fosfolipidikalvoon (40). Polymeerien käyttö ytimenä perustuu puolestaan oligonukleotideihin konjugoitujen hydrofobisten polymeeriketjujen muodostamaan miselliin (41). Misellin muodostukseen perustuen polymeeripallonukleiinihappoja voidaan hyödyntää esimerkiksi faasinvaihtoaineena (41). Proteiinipallonukleiinihappoja hyödynnetään oligonukleotidin sijaan huonosti soluun kulkeutuvan proteiinin solukuljetuksen parantamiseksi (42). Proteiini peitetään oligonukleotideilla, jotka auttavat sen solukuljetuksessa (42). Oligonukleotidikonjugaateista huolimatta proteiini säilyttää kolmiulotteisen muotonsa ja aktiivisuutensa ja on siten valmis vaikuttamaan heti soluun päästyään (42).

Huolimatta edellä mainittujen erilaisten epäorgaanisten ja orgaanisten keskusrakenteiden tuomista uusista hyvistä ominaisuuksista, kaikki edellä mainitut rakenteet johtavat kuitenkin

pallonukleiinihappoihin, joissa keskusrakenteeseen kiinnittyneiden oligonukleotidien määrä vaihtelee. Vaihtelua aiheuttaa keskuspartikkelien koon vaihtelu ja erot kiinnittyneiden oligonukleotidien määrässä. Pallonukleiinihappojen rakenteen ja toiminnan yhteyttä on vaikeaa tutkia, jos pallonukleiinihapot poikkeavat aina hieman toisistaan. Ratkaisuksi tähän ongelmaan Mirkin ym. alkoivat kehittää keskusrakenteita, joihin konjugoitujen juosteiden määrää olisi aina sama. Kyseessä oli siis niin sanotut molekulaariset pallonukleiinihapot. Keskusrakenteeseen kiinnitettyjä juosteita pitäisi olla tarpeeksi vähän, jotta eri määrillä juosteita konjugoidut pallonukleiinihapot pystytään erottamaan toisistaan, mutta tarpeeksi tiheässä, jotta pallonukleiinihappojen edulliset ominaisuudet säilyisivät. (28)

Lopulta Mirkin ym. päätyivät syntetisoimaan kaksi erilaista ydinrakennetta. He kiinnittivät 12 atsidilinkkeriä kaupalliseen [C60]-fullereeniin ja 8 atsidilinkkeriä kaupalliseen polyoktaedriseen silseskvioksaaniin (poly octahedral silsesquioxane POSS). Dibentsosyklo-oktyynillä (DBCO) muokatut antisense-DNA-juosteet kiinnitettiin ydinten atsidiryhmiin vesiliuoksessa. Valmistettujen pallonukleiinihappojen pysyvyyttä, soluun ottoa ja geenin hiljennystä verrattiin paljaaseen antisense-DNA:han. Kokeissa kumpikin pallonukleiinihappo kulkeutui soluihin, mutta [C60]-fullereeni- selvästi POSS-pallonukleiinihappoa paremmin. [C60]-fullereenipallonukleiinihappo hiljensi geenin ilmennystä huomattavasti (81 %), kun taas POSS-pallonukleiinihappo hiljensi geeniä vähän (15 %). (28)

Sittemmin pallonukleiinihapposynteesi on kehittynyt vielä lisää, kun Turun yliopiston tutkijat julkaisivat menetelmän atsidein muokatun [C60]-fullereeniytimen kaksivaiheisesta SPAAC (strain promoted alkyne-azide cycloaddition) -konjugaatiosta. Menetelmä mahdollistaa yhden käsivarren spesifisen liittämisen ytimeen ennen koko rakenteen kokoamista. Spesifinen [C60]-fullereenin monokonjugaatio perustuu tuotteen liukoisuusominaisuuksien muuttumiseen. Monokonjugaatio hydrofobisen [C60]-fullereeniytimen ja negatiivisesti varautuneen hydrofiilisen oligonukleotidin välillä tehdään DMSO:ssa. Elektrostaattinen repulsio ja orgaaninen liuotinympäristö kontrolloivat reaktiota ja ehkäisevät tuotteen reagoimisen helposti edelleen. Loput 11 käsivartta on kiinnitettävissä hydrofiilisemmaksi muuttuneeseen keskusrakenteeseen vesiliuoksessa. Menetelmällä voidaan valmistaa pallonukleiinihappoja, joissa yhteen käsivarteen on liitetty jokin leima tai muu haluttu toiminnallinen ryhmä. (43)

1.2.2 Pallonukleiinihappojen solukuljetus reseptorivälitteisellä endosytoosilla

Yksi keskeisimpiä pallonukleiinihappojen edullisia ominaisuuksia on niiden tehokas solukuljetus. Pallonukleiinihappojen on havaittu kulkeutuvan tehokkaasti moniin erityyppisiin

soluihin ilman transfektioreagensseja. Ominaisuus on yllättävä, sillä pallonukleiinihappojen pinta on täynnä negatiivisesti varautuneita oligonukleotideja. Kuljetusmenetelmää onkin tutkittu aktiivisesti, jotta soluun ottoa voitaisiin ymmärtää paremmin ja siten sen mekanismia hyödyntää myös muissa sovelluksissa. (44)

Giljohann ym. osoittivat tutkimuksessaan (44), että pallonukleiinihappojen solukuljetus on sitä tehokkaampaa, mitä suurempi niiden pinnan oligonukleotiditiheys on. Lisäksi he saivat selville, että positiivisesti varautuneet seerumin proteiinit vuoraavat pallonukleiinihappojen oligonukleotidipinnan ja, että näiden proteiinien suuri määrä korreloi myös tehokkaampaan solukuljetukseen. Tutkimuksessa pallonukleiinihapot kulkeutuivat hyvin myös erityyppisiin soluihin, mutta solutyypin välillä oli eroa kuljetuksen tehossa. (44)

Vaikka pallonukleiinihappojen solukuljetuksesta opittiin Giljohannin ym. tutkimuksen (44) myötä paljon lisää, oli niiden soluun otton mekanismi silti vielä epäselvä. Patel ym. jatkoivat selvitystyötä ja osoittivat tutkimuksessaan (45) soluun otton tapahtuvan scavenger-reseptorien välityksellä. Scavenger-reseptorit ovat hahmontunnistusreseptoreja, jotka tunnistavat polyanionisia ligandeja niiden rakenteen perusteella. Pallonukleiinihappojen tiheä oligonukleotidikuori matkii scavenger-reseptorien luonnollisia polyoligonukleotidiligandeja ja saa siten aikaan reseptorien aktivoitumisen ja pallonukleiinihapon kuljetuksen soluun. Päinvastoin kuin Giljohannin ym. tutkimuksessa (44), Patel ym. havaitsivat seerumin proteiinien haittaavan pallonukleiinihappojen solukuljetusta. He arvioivat pallonukleiinihappojen sitoutuvan korkealla affiniteetillä sekä plasman proteiineihin että scavenger-reseptoreihin. Tämä voisi selittää Giljohannin ym. tuloksissa olleen korrelaation pallonukleiinihappoon sitoutuneiden plasman proteiinien määrän ja pallonukleiinihappojen korkean soluun otton välillä. Todellisuudessa soluun otto scavenger -reseptoriin sitoutumalla siis kilpailee plasman proteiineihin sitoutumisen kanssa. (45)

Pallonukleiinihappojen soluun ottoon osallistuvan reseptorin löytämisen jälkeen Choi ym. (46) tutkivat tarkemmin soluun ottoon osallistuvaa scavenger-reseptoria ja sen aktivoitumisesta seuraavaa solunsisäistä endosytoosireittiä. Tutkimuksessaan Choi ym. osoittivat A-alatyypin scavenger-reseptorien olevan keskeisiä pallonukleiinihappojen soluun otolle: scavenger-A-reseptorista kilpailevat muut ligandit tai reseptorin puuttuminen vähensivät pallonukleiinihappojen soluun ottoa merkittävästi, mutta scavenger-B-reseptorin puuttuminen ei vaikuttanut pallonukleiinihappojen soluun ottoon. Lisäksi Choi ym. selvittivät mikroskopialla, että solun pintaan kiinnittymisen ja solukalvon mukana solun sisään

painautumisen (engl. invagination) jälkeen pallonukleiinihappojen solunsisäinen endosytoosi toimii lipidisaarekkeiden syvennyksen (engl. caveolar lipid-raft) välityksellä. (46)

1.2.3 Pallonukleiinihappojen käyttö siRNA-terapian solukuljettimina

Tehokkaan ja tutkitun solukuljetusmekanismin sekä suuren nukleaasipysyvyyden ja vähäisen immuunireaktioiden aktivaation ansiosta pallonukleiinihapot ovat hyviä solukuljettimia oligonukleotidi-terapiaille (45). Oligonukleotidien solukuljetusta on aiemmin tehostettu käyttämällä erilaisia solukuljettimia, kuten viruksia, polymeereja, liposomeja ja dendrimeerejä (47). Liposomeja on pidetty näistä optimaalisimpana solukuljettimena (26). Edellä mainitut kuljetinsysteemit voivat kuitenkin olla myös haitallisia. Monet solukuljettimet, kuten erilaiset polymeerit ja kationiset liposomit ovat toksisia. Virusvektorit voivat toksisuuden lisäksi aiheuttaa myös vakavan immuunireaktion (48). Pallonukleiinihapot ovat parempi ei-toksinen vaihtoehto erillisten solukuljettimien käytölle. Vähäisen toksisuuden lisäksi ne kuljettavat oligonukleotideja soluihin huomattavasti erillisiä solukuljettimia tehokkaammin (30). Pallonukleiinihapot soveltuvat käytettäväksi sekä antisense- että siRNA-välitteisessä geenien hiljennyksessä (45).

Pallonukleiinihappoja käytettiin aluksi antisense-oligonukleotidien solukuljettimena, mutta Giljohann ym. kiinnostuivat kokeilemaan, saataisiinko pallonukleiinihappoista vastaavanlaista hyötyä myös siRNA:illa (47). Kokeessaan he osoittivat, että kultananopartikkelin pintaan pakatut siRNA:t kulkeutuivat soluihin paremmin kuin transfektioagensseja käytettäessä, ja että myös siRNA:illa oligonukleotidien tiheä pakkaaminen lisää stabiiliutta nukleaaseja vastaan (47). Tämän jälkeen pallonukleiinihappoja on käytetty monen eri siRNA:n solukuljettimena. Niiden on osoitettu esimerkiksi läpäisevän veri-aivoesteen ja pienentävän syöpäkasvaimia glioblastooman eläinmalleissa sekä kulkeutuvan spesifisesti kohteeseensa myös systeemisesti syöpäpotilaille annosteltaessa (49). Lisäksi siRNA-pallonukleiinihappojen on osoitettu auttavan tyypin 2 diabeteksen aiheuttamaan haavojen huonoon paranemiseen eläinmalleissa paikallisesti annosteltuna (50).

Huolimatta pallonukleiinihappojen laajasta käytöstä siRNA-terapian solukuljettimena, niiden RNA-interferenssiä aktivoiva mekanismi löydettiin vasta vuonna 2020, jolloin Yamankurt ym. selvittivät, miten siRNA-pallonukleiinihapot soluissa vaikuttaa. Entistä parempien pallonukleiinihappojen suunnittelemiseksi on kriittistä tietää, vaatiiko geenien hiljennys siRNA:n irrotusta ydinrakenteesta ja tapahtuuko RNA-interferenssin aktivaatio samaa reittiä kuin luonnollisesti vai osallistuvatko siihen jotkin muut proteiinit ja entsyymit. (51)

Kokeissaan Yamankurt ym. osoittivat, että pallonukleiinihapot aktivoivat RNA-interferenssiä soluissa yhden tietyn mekanismin kautta. Mekanismi vaatii kaksijuosteisen siRNA:n irrotuksen pallonukleiinihapon pinnalta, jonka jälkeen siRNA aktivoi RNA-interferenssiä luonnollisen reaktiotien kautta. Mekanismissa Dicer-2-ribonukleaasin ja Loquaciouksen muodostama kompleksi irrottaa ensin kaksijuosteiset siRNA:t keskusrakenteen pinnalta. Tämän jälkeen mekanismi on sama kuin luonnollisessa RNA-interferenssissä: Dicer-2 ja R2D2 kiinnittyvät siRNA:han ja syntyy RDI (R2D2-Dicer2 initiator) -kompleksi. Tämän jälkeen Argonaute 2 liittyy RDI-kompleksiin ja hajottaa siRNA:n sense-juosteeseen. Näin syntyy aktiivinen RISC (RNA induced silencing complex) -kompleksi. Kun RISC-kompleksin siRNA:n antisense-juosteeseen pariutuu komplementaarinen mRNA, kompleksi hajottaa mRNA:n entsyymaattisesti ja geenin ilmennys estyy. (51)

1.3 Silmänpohjan ikärappeuma kansanterveydellisenä ongelmana

1.3.1 Taudin yleisyys, määritelmä ja synty

Silmänpohjan eli verkkokalvon ikärappeuma on yleisin pysyvään sokeutumiseen johtava tekijä yli 65-vuotiailla kehittyneiden maiden ihmisillä. Vuonna 2020 silmänpohjan ikärappeumaa sairasti 200 miljoonaa ihmistä maailmanlaajuisesti ja tauti aiheutti 9 % kaikista tapahtuneista sokeutumisista (52). Silmänpohjan ikärappeuma on nopeasti etenevä verkkokalvon tarkan näkemisen alueen eli makulan sairaus, jossa makulan rakenteen vaurioituminen johtaa pysyvään näön menetykseen. (53)

Suurin silmänpohjan ikärappeuman riskitekijä on ikä, ja siksi väestön ikääntyessä silmänpohjan ikärappeumatautitapausten määrä tulee kasvamaan. Elämäntavoista tupakointi lisää huomattavasti riskiä taudin kehittymiseen ja etenemiseen, mutta myös ylipaino, sydän- ja verisuonitaudit sekä korkea verenpaine altistavat silmänpohjan ikärappeuman kehittymiselle. Iän ja elämäntapojen lisäksi on löydetty myös monia geenejä, jotka altistavat silmänpohjan rappeumataudille. Kaksi tärkeintä riskialleelia ovat CFH (complement factor H) ja ARMS2 (age-related maculopathy susceptibility 2) -geenien polymorfismit. (54)

Silmänpohjan rappeumataudissa makulan alueelle kertyy kuona-ainekokkareita eli durseneita. Kuona-ainekokkareet ovat ensimmäinen merkki sairaudesta, joka vielä alkuvaiheessa on usein oireeton. Kuona-ainekokkareiden määrän ja koon perusteella voidaan ennustaa taudin

etenemisen riskiä ja nopeutta. Mikäli kuona-ainekokkareita on paljon tai jokin niistä on suurikokoinen, puhutaan jo keskivaiheen sairaudesta, joka todennäköisesti kehittyy vaikeaksi myöhäisen vaiheen sairaudeksi. (53)

Silmänpohjan rappeumataudin alkuvaihe, eli kuona-ainekokkareiden kertyminen ja verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen vaurioituminen, voi kehittyä keskenään hyvin erilaisiksi pitkälle edenneiksi taudeiksi. Myöhäisen vaiheen tautityyppejä on kaksi: kuiva ja nesteinen rappeuma. Kuivassa rappeumassa verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut, valoastinsolut ja suonikalvoston verisuonitus tuhoutuvat vähitellen erityisesti makulan alueella. Verkkokalvon tuhoutuminen etenee hitaasti vuosien aikana ja johtaa lopulta sokeutumiseen. Näkö menetetään ensin näkökentän keskeltä tarkan näön alueelta, jolloin lukeminen ja kasvojentunnistus vaikeutuvat. (54)

Silmänpohjan rappeumataudin alkuvaihe voi edetä myös nesteiseksi rappeumaksi, jossa näkökyky heikkenee nopeasti. Nesteisessä rappeumassa silmänpohjan suonikalvoston verisuonten uudismuodostus on hallitsematonta: verisuonia muodostuu liikaa ja ne ovat hauraita. Verisuonet myös tihkuvat nestettä ympäristöönsä, mikä aiheuttaa turvotusta. Lisäksi verisuonet ja verkkokalvon pigmenttiepiteeli ovat alttiita repeytymiselle. Turvotus ja epiteelin repeytyminen ovat molemmat muutoksia, jotka johtavat näön nopeaan heikkenemiseen. Kosteaa rappeumaa onkin siis aggressiivinen ja esimerkiksi lukukyky voidaan menettää muutamassa päivässä. (54)

Silmänpohjan ikärappeuman patogeneesiä ei vielä täysin tunneta, mutta jo pitkään on tiedetty verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen tulehduksen liittyvän taudin etenemiseen. Nykykäsityksen mukaan pigmenttiepiteelisolujen puhtaanapitojärjestelmän heikentyminen aiheuttaa soluissa tulehduksen, mikä johtaa lopulta pigmenttiepiteelisolujen rappeutumiseen sekä sen seurauksena valoastinsolujen tuhoutumiseen ja näkökyvyn menettämiseen. (55)

Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut muodostavat veri-verkkokalvoesteen valoastinsolujen muodostaman hermostollisen verkkokalvon ja suonikalvon väliin. Pigmenttiepiteelisolujen tehtävä on ylläpitää valoastinsoluja siirtämällä niihin happea ja ravinteita verenkierrosta sekä poistaa ja hajottaa valoastinsolujen aineenvaihduntatuotteita. Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut kohtaavat erityisen paljon stressiä tarkan näkemisen alueella, sillä siellä verenkierto on vilkasta, jatkuva valoastistus korkeaa ja aineenvaihdunta voimakasta. Lisäksi valoastinsolujen tyydyttymättömät rasvahapot hapettuvat haitallisiksi

aineenvaihduntatuotteiksi. Iän myötä verenkierto heikkenee, jolloin pigmenttiepiteelisolut eivät saa tarpeeksi nopeasti happea ja ravinteita. (55)

Verenkierron lisäksi myös autofagia on keskeistä pigmenttiepiteelisolujen toiminnalle. Autofagia on solunsisäinen puhdistusmenetelmä, jossa lysosomaaliset entsyymit hajottavat proteiinikertymiä ja viallisia soluelimiä. Ikääntyessä soluihin alkaa kertyä proteiinien, rasvojen ja hiilihydraattien muodostamaa lipofuskiinia, joka estää lysosomaalisten entsyymien toimintaa. Kun autofagia ei toimi, soluun alkaa kertyä proteiineja ja viallisten mitokondrioiden aiheuttama oksidatiivinen stressi lisääntyy. Myös kertyvä lipofuskiini lisää reaktiivisten happiyhdisteiden tuottoa solussa. Oksidatiivinen stressi johtaa pro-inflammatoristen sytokiinien eritykseen ja pigmenttiepiteelisolujen tulehdukseen. (55)

Pigmenttiepiteelisolujen tulehduksen on osoitettu olevan taustalla sekä kuivassa että nesteisessä rappeumassa. Tulehdustilan lisäksi nesteisessä rappeumassa myös verisuonen epiteelikasvutekijä (vascular endothelial growth factor, VEGF) on keskeinen tautimuodon synnyssä. VEGF on tärkeä terveen ja normaalin verisuonituksen ylläpitäjä, mutta silmänpohjan ikärappeumassa verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen hapenpuute saa aikaan tiettyjen VEGF:n alatyypien epätavallisen korkean ilmennyksen. Liiallinen VEGF:n ilmennys tehostaa verisuonten uudismuodostusta liikaa ja tuloksena on ylisuuri määrä vuotavia, herkästi repeytyviä verisuonia, mikä pahentaa tautia entisestään. (53)

1.3.2 Taudin hoito

Silmänpohjan ikärappeuman aggressiivisimpaan muotoon, nesteiseen silmänpohjan ikärappeumaan, otettiin käyttöön ensimmäinen lääke vuonna 2005. Vuoteen 2020 mennessä myös kolme muuta lääkettä hyväksyttiin käyttöön. Kaikki neljä lääkettä toimivat samalla mekanismilla. Ne estävät VEGF:ää eli ovat anti-VEGF-lääkkeitä. VEGF:n estämisen pääasiallinen vaikutus on vähentää verisuonten epiteelin läpäisevyyttä, jolloin vähemmän nestettä siirtyy verisuonesta silmän verkkokalvoon. Lisäksi esto vähentää patologista verisuonten uudismuodostusta. Anti-VEGF-lääkkeillä ei voida pysäyttää tautia aiheuttavaa mekanismia, mutta niillä voidaan hidastaa verkkokalvon vaurion muodostumista ja siten ylläpitää näkökykyä pidempään. Kaikki neljä anti-VEGF-läkettä annostellaan injektioimalla silmän lasiaiseen kuukausittain. Niillä ei ole vaikutusta taudin varhaisemmassa vaiheessa, ja ne tehoavat ainoastaan nesteisen tyypin rappeumaan. (54)

Kuivaan silmänpohjan ikärappeumaan puolestaan ei ole vielä olemassa lääkehoitoa. Joitakin kliinisiä kokeita on tehty, mutta hoitojen tehoa ei ole pystytty osoittamaan. Kaikki kehitetyt hoidot ovat kohdentuneet taudin liian myöhäiseen vaiheeseen, jossa verkkokalvon valoastinsolut on jo menetetty pysyvästi, eikä niiden vaurioitumista pystytä enää estämään tai hidastamaan. Lisää perustutkimusta taudin syntymekanismista tarvitaan, jotta parempia, aikaisemmassa vaiheessa vaikuttavia ja tehokkaista lääkehoitoja saataisiin kehitettyä. (54)

1.3.3 Silmänpohjan ikärappeuman tulevaisuuden hoitomuodot ja RPE-solumalli

Koska kummankin pitkälle edenneen silmänpohjan rappeuman taustalla on tulehdusreaktio, voisi olla hyödyllistä kehittää lääkehoito, joka hiljentää pro-inflammatoristen geenien ilmennystä verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluissa. Yksi selektiivinen ja sekvenssispesifinen tapa hiljentää pro-inflammatorisia genejä voisi olla siRNA-terapia. siRNA:n teho on osoitettu monen eri sairauden hoidossa ja monessa eri kohdekudoksessa. siRNA-terapiaa on myös hyväksytty jo kliiniseen käyttöön. Silmä on optimaalinen kohde-elin siRNA-terapialle, sillä silmällä on oma immunologinen ympäristö ja se on eristyksissä muista kudoksista, mikä mahdollistaa paikallisen annostelun ilman systeemisiä haittavaikutuksia. Paljas siRNA kulkee kohteeseensa silmässä kuitenkin heikosti. Sopivan solukuljettimen avulla sen pääsyä verkkokalvon epiteelisoluihin voitaisiin parantaa. (56)

Ramsay ym. Itä-Suomen yliopistosta ovat tutkineet kahta silmänpohjan rappeumatautiin liittyvää geeniä, GAPDH:ta ja IL-6:tta, hiljentävää siRNA:ta silmän pohjan rappeumataudin RPE (retinal pigment epithelium) -solumalleissa (56). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) on solujen ylläpitogeneeni, joka on keskeinen solun energia-aineenvaihdunnassa (57). GAPDH:n on kuitenkin osoitettu olevan merkittävä osa myös apoptoosin signaalikaskadia, ja siksi sen ilmennyksen hiljentäminen voisi estää pigmenttiepiteelisolujen tuhoutumista silmänpohjan rappeumataudissa (57). IL-6 (interleukiini 6) puolestaan on tulehdusta välittävä tekijä, joka on liitetty kroonisiin tulehdustiloihin (58). IL-6:n kohonneen määrän ja kuivan rappeuman välillä on osoitettu olevan selkeä korrelaatio, mikä kertoo inflammaation olevan keskeinen tekijä erityisesti silmänpohjan rappeuman kuivassa tautimuodossa (58).

Kokeissaan Ramsay ym. osoittivat sekä GAPDH-siRNA:n että IL-6-siRNA:n hiljentävän geenien ilmennystä ihmisen ARPE-19-solulinjan soluissa. Jakautuvissa soluissa IL-6:n ilmennys väheni 60–70 % sekä erilaistuneissa soluissa IL-6:n ilmennys väheni 40–60 % ja GAPDH:n ilmennys 60–90 % käytetystä solukuljettimesta riippuen. Tutkimuksessa käytettiin

lipopleksejä ja lipidoideja sekä kaupallisia solukuljettimia. Kaikki kuljetinmolekyylit siirtyivät hyvin jakautuviin soluihin, mutta erilaistuneihin soluihin ainoastaan lipidoidit siirtyivät tehokkaasti. Lipidoidit siirtyivät 90 %:iin tutkituista soluista, kun taas lipoplekseilla ja kaupallisilla solukuljettimilla tulos oli vain 20–40 %. siRNA:t siis tehosivat, mutta niille ei ole vielä löydetty optimaalista solukuljetinta. (56)

Ramsayn ym. saamat soluun otton tulokset olivat erilaisia jakautuvissa ja erilaistuneissa RPE-soluissa. Artikkelissaan he korostavatkin solumallin valinnan merkitystä siRNA:n tehoa ja solukuljetusta tutkivissa solukokeissa, sillä solujen erilaistuminen muuttaa solujen endosytoosia. Erilaistuneet RPE-solut ovat fysiologisesti parempi malli veri- verkkokalvoesteen muodostaville pitkälle erilaistuneille verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluille. Ramsay ym. painottavat, että jakautuvat ARPE-19-solut ovat helppo ja edullinen malli siRNA:iden alkuvaiheen testaukseen, mutta erilaistuneissa soluissa toimiviksi osoitetut siRNA:n kuljettimet toimivat varmemmin myös *in vivo*. (56)

1.4 Työn tarkoitus

Tässä työssä etsitään ratkaisua silmänpohjan ikärappeumaan kehitetyn GAPDH-siRNA:n solukuljetukseen. GAPDH-siRNA:sta syntetisoidaan pallonukleiinihappoja käyttämällä kahta eri ydinrakennetta: atsidimuokattua [C60]-fullereenia ja POSS:ia, Lisäksi pallonukleiinihappoista valmistetaan kolesterolikonjugoidut versiot.

Lopulta valmistetut ja karakterisoidut pallonukleiinihapot lähetetään Itä-Suomen yliopistoon RPE-solumallissa tutkittaviksi. Solukokeissa selvitetään pallonukleiinihapon vaikutus siRNA:n soluun ottoon ja geenin hiljennyksen tehokkuuteen. Hypoteesina on, että pallonukleiinihapot siirtyvät soluun paljasta siRNA:ta paremmin, ja että kolesterolin konjugoiminen pallonukleiinihapon pintaan lisää solukuljetusta edelleen. Lisäksi kolesterolikonjugoinnin odotetaan tehostavan pallonukleiinihappojen pakkaamista ekstrasellulaarisin vesikkeleihin, joita voitaisiin hyödyntää lisäämään solukuljetusta entisestään.

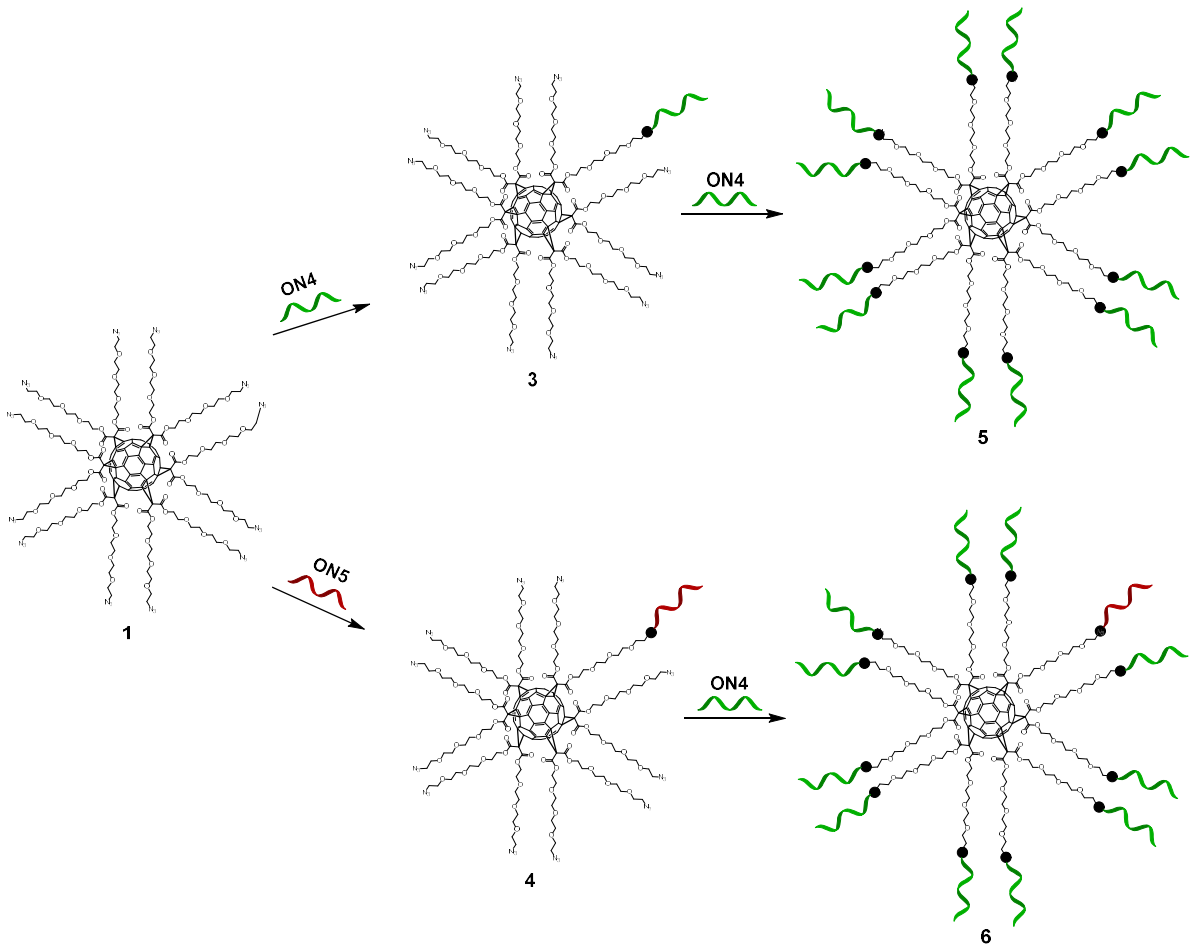
Solukokeiden lisäksi keskusrakenteen vaikutusta valmistettujen pallonukleiinihappojen ominaisuuksiin arvioidaan tehtyjen karakterisointien perusteella. Keskusrakenteita vertaillaan käytettyjen synteesi- ja puhdistusmenetelmien toimivuuden, saatujen tuotteiden laadun ja hybridisoitujen pallonukleiinihappojen pysyvyyden osalta.

Onnistuessaan tällä tutkimuksella voisi olla suuri merkitys varsinkin kuivaa silmänpohjan ikärappeumaa sairastaville potilaille. Jos jokin tässä työssä valmistetuista pallonukleiinihapoista osoittautuu tehokkaaksi siRNA-terapian solukuljettimeksi RPE-soluihin, ollaan taas yhden askelen lähempänä ensimmäistä lääkettä sairauteen, johon ei tällä hetkellä ole olemassa hoitokeinoa.

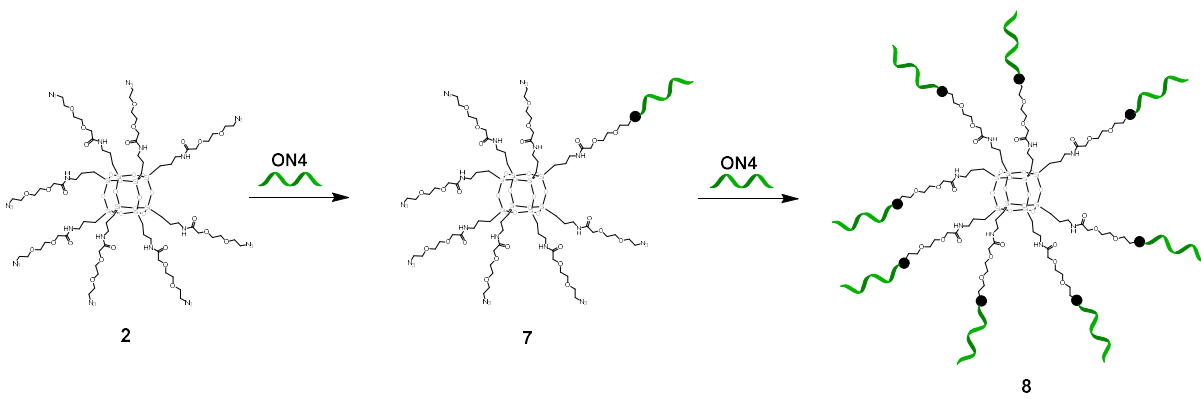
2 Tulokset ja niiden tarkastelu

Tässä tutkimuksessa valmistettiin kolme erilaista GAPDH-siRNA:n sense-juosteen sisältävää pallonukleiinihappoa (**5**, **6** ja **8**) kahta eri keskusrakennetta (**1** ja **2**) käyttäen. Atsidimuokatusta [C60]-fullereeniytimeistä (**1**) valmistettiin leimaton ja fluoreskeinilla monoleimattu variantti (Kaavio 1) sekä häkkimäisestä silseskvioksaani (POSS)-ytimestä (**2**) leimaton pallonukleiinihappo (Kaavio 2). Pallonukleiinihappojen valmistuksessa käytettiin aminomuokattuja oligonukleotideja (**ON1–ON3**) (Kaavio 4). Sense-juosteisiin (**ON1** ja **ON2**) liitettiin bisyklononyyni (BCN) karbamaattikytkennällä ja antisense-juosteeseen **ON3** kolesteroli amidikytkennällä. Oligonukleotidit (**ON4** ja **ON5**) kiinnitettiin keskusrakenteisiin rengasjännityksen tehostamalla alkyyni–atsidi-sykloadditiolla (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC).

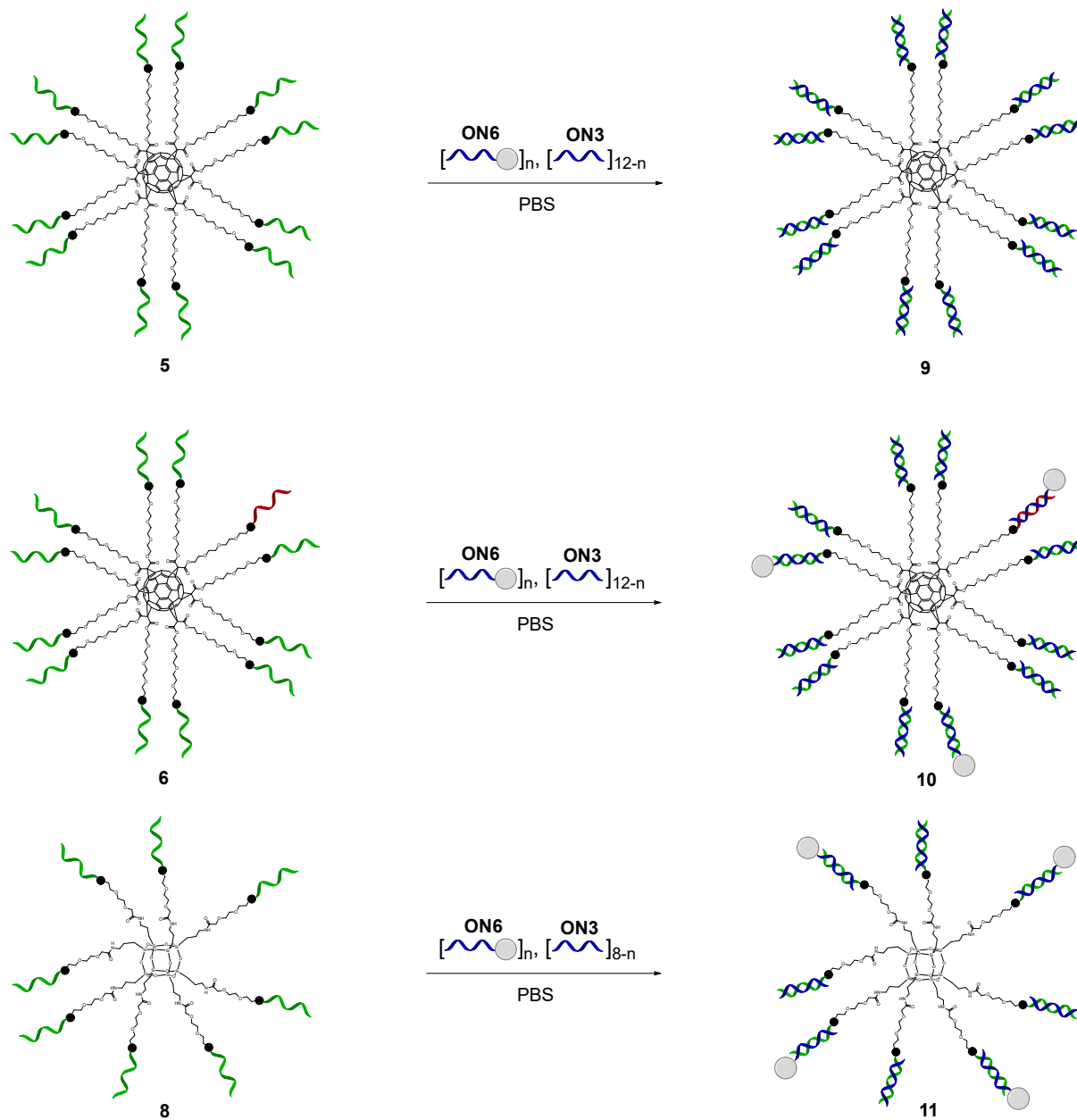
GAPDH-siRNA:n sense-juosteen sisältävät pallonukleiinihapot (**5**, **6** ja **8**) hybridisoitiin antisense-juosteen (**ON3**), sen kolesterolikonjugaatin (**ON6**) tai näiden seosten kanssa (Kaavio 3). Tuloksena oli GAPDH-siRNA-pallonukleiinihapot **9–11**. Kolesterolimodifikaation tarkoitus oli muuttaa ko. pallorakenteiden kuljetinominaisuuksia ja edesauttaa niiden mahdollista pakkaamista ekstrasellulaarisiin vesikkeleihin. Pallonukleiinihapot karakterisoitiin SEC-MALS:illa (Size-Exclusion Chromatography–Multiple Angle Light Scattering), sulamislämpö (T_m) -mittauksin ja DLS:llä (Dynamic Light Scattering).



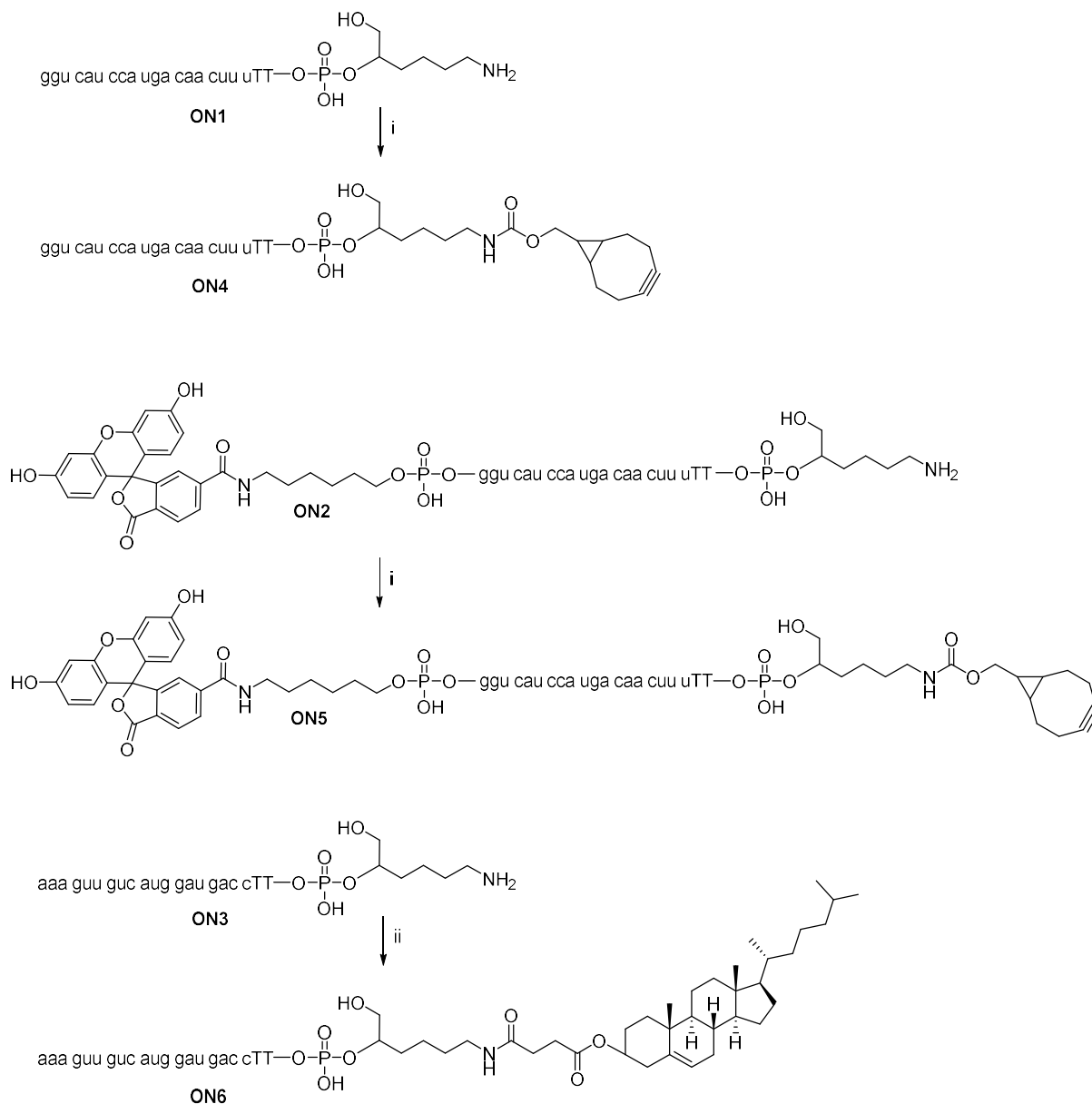
Kaavio 1: [C60]-fullereenipallonukleiinihappojen valmistus.



Kaavio 2: POSS-pallonukleiinihappojen valmistus.



Kaavio 3: Pallonukleiinihappojen hybridisaatio antisense-juosteiden (ON3 ja ON6) seoksilla.

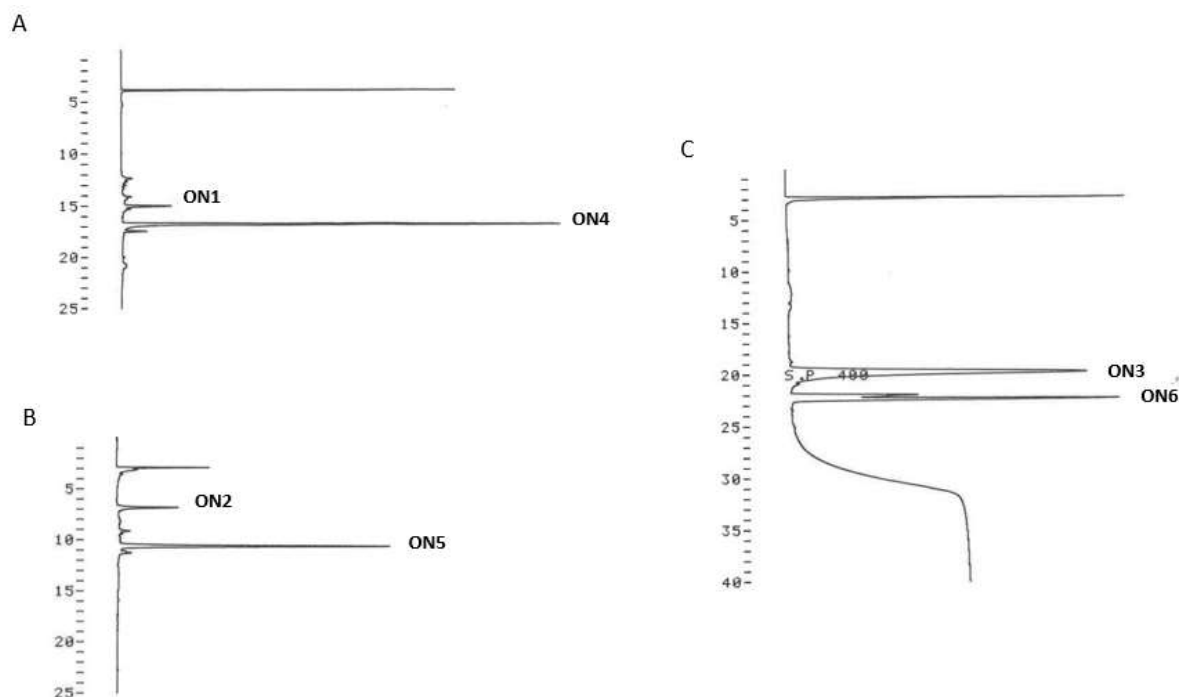


Kaavio 4: Työssä käytettyjen BCN- tai kolesterolikonjugoitujen oligonukleotidien (**ON4–ON6**) valmistus aminomuokattuista oligonukleotideista (**ON1–ON3**). i) 15 ekv. BCN-NHS, DMSO, 2 h huoneenlämmössä. ii) 15 ekv. kolesteroli-NHS, DMSO, 2 h huoneenlämmössä.

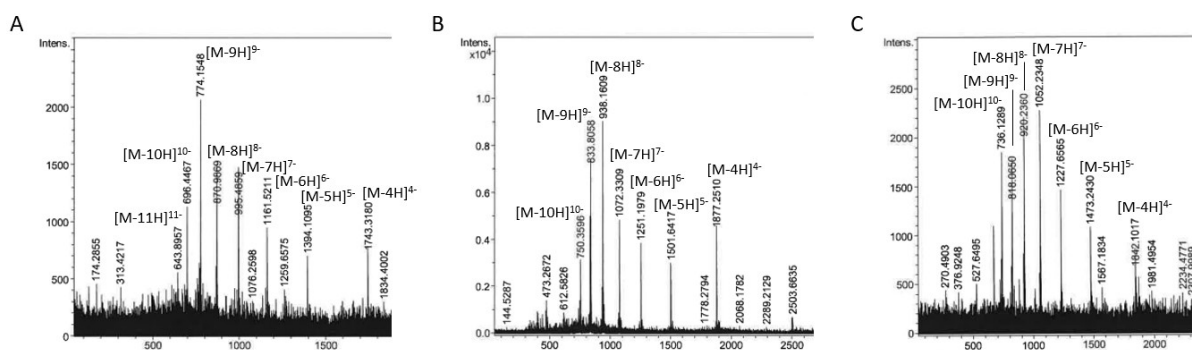
2.1 RNA-juosteiden muokkaukset

Pallonukleiinihappojen (**5**, **6** ja **8**) valmistamiseksi kaupallisiin aminomuokattuihin RNA-juosteisiin (**ON1–ON3**) konjugoitiin joko bisyklonyyini (BCN) tai kolesteroli. Terapeuttisen siRNA:n leimattomaan ja leimalliseen sense-juosteeseen (**ON1** ja **ON2**) liitettiin BCN ja niihin hybridisoitavaan antisense-juosteeseen (**ON3**) kolesteroli. Konjugaatioreaktiot tehtiin juosteen 3'-päähän aminoryhmän ja konjugoivan rakenteen välisellä karbamaattikytkennällä (BCN) tai amidin muodostavalla reaktiolla (kolesteroli). RNA-konjugaatit puhdistettiin RP-HPLC:llä (**Error! Reference source not found.**). BCN:n liittäminen oligonukleotideihin tapahtui lähes

kvantitatiivisesti, mutta kolesterolikonjugaatit jäivät vajaaksi. Tuotteiden UV-spektrofotometrisesti määritetyt eristetyt saannot olivat hyviä (48–65 %). Tuotteiden mitatut massaspektrit (Kuva 2) vastasivat niiden laskennallisia massoja ja siten osoittivat, että reaktioista saatiin halutut tuotteet.



Kuva 1: RNA-konjugaattien RP-HPLC profiilit. A) sense-juosteen BCN-konjugaatio. B) leimallisen sense-juosteen BCN-konjugaatio. C) antisense-juosteen kolesterolikonjugaatio.



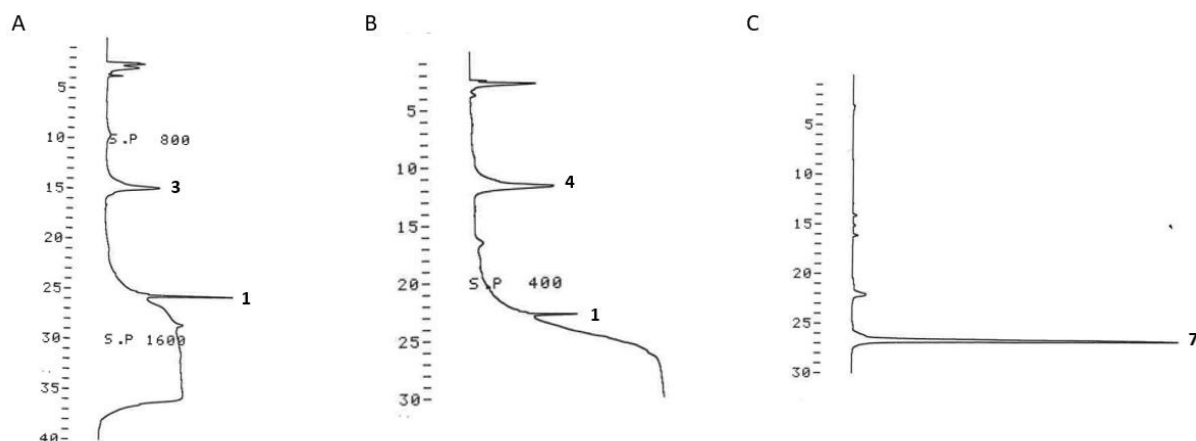
Kuva 2: RNA-konjugaattien massaspektrit. A) sense-juosteen BCN-konjugaatio. B) leimallisen sense-juosteen BCN-konjugaatio. C) antisense-juosteen kolesterolikonjugaatio.

2.2 Pallonukleinihappojen synteesit

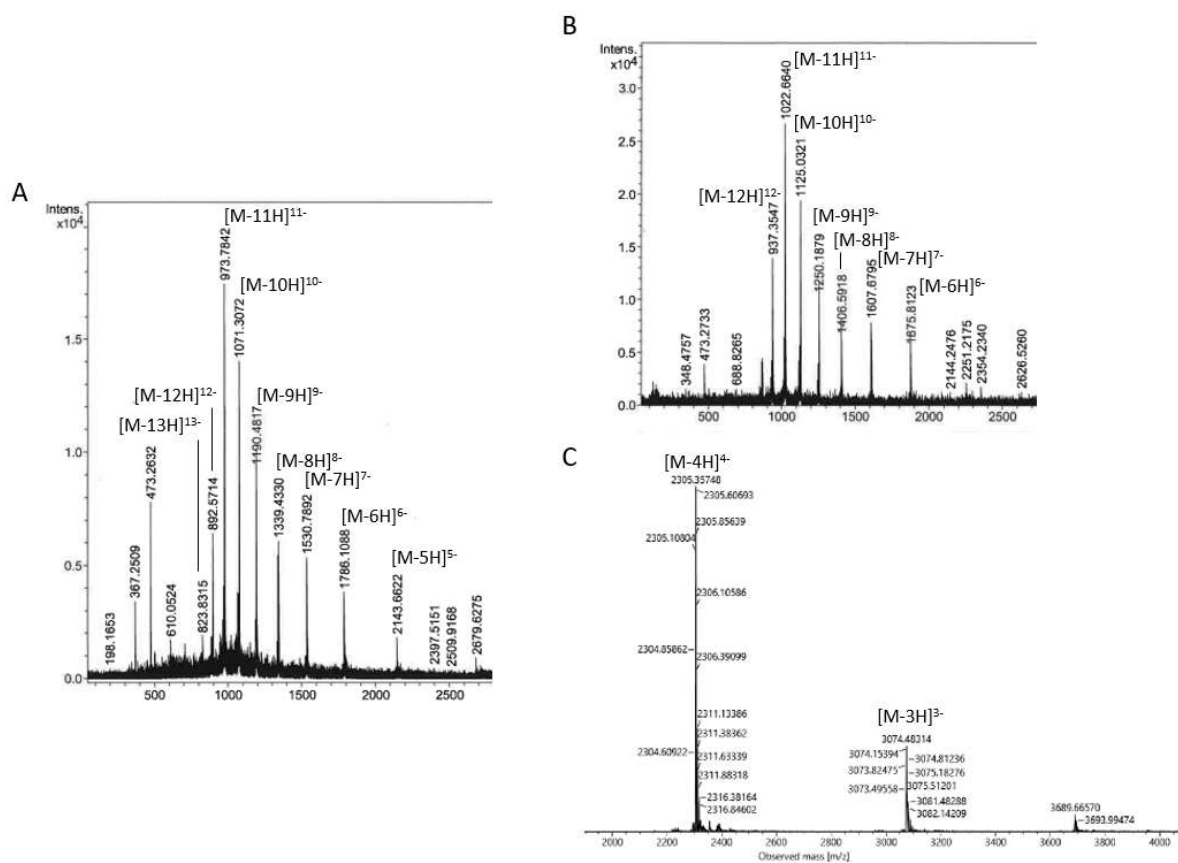
Muokatuista RNA-juosteista valmistettiin kolme erilaista GAPDH-siRNA:n sense-juosteen sisältävää pallonukleinihappoa (5, 6, ja 8). Käytettyihin keskusrakenteisiin, [C60]-fullereeniin

(1) ja POSS:iin (2) liitettiin ensin selektiivisesti yksi BCN-modifioitu juoste, leimaton **ON4** tai fluoreskeiinileimattu **ON5**. SPAAC-konjugointi tapahtuu selektiivisesti DMSO:ssa, kun käytetään ylimäärää keskusrakennetta (3 ekv. **1**:ä tai 5 ekv. **2**:a) oligonukleotidiin (**ON4** tai **ON5**) nähden. Saatujen tuotteiden (**3**, **4** ja **7**) SPAAC-konjugointeja jatkettiin vesiliuoksessa käyttämällä ylimäärin (18 ekv. [C60]-fullereenin ja 12 ekv. POSS:in monosubstituutiotuotteilla) leimaamatonta **ON4**:ää, mikä johti haluttuihin SNA-rakenteisiin (**5**, **6**, ja **8**).

Monosubstituutiotuotteet puhdistettiin RP-HPLC:llä (Kuva 3). HPLC:n perusteella reaktiot menivät hyvin: oligonukleotideja ei näyttänyt jääneen jäljelle ja tuotepiikit **3**, **4** ja **7** näyttivät puhtailta. Tuotteiden UV-spektrofotometrisesti määritetyt eristetyt saannot (26–60 %) vaihtelivat kuitenkin kohtalaisen paljon. Monosubstituutiotuotteiden massaspektrit mitattiin ennen täyssubstituutioon siirtymistä. Mitatut massaspektrit (Kuva 4) vastasivat tuotteiden laskennallisia massoja.

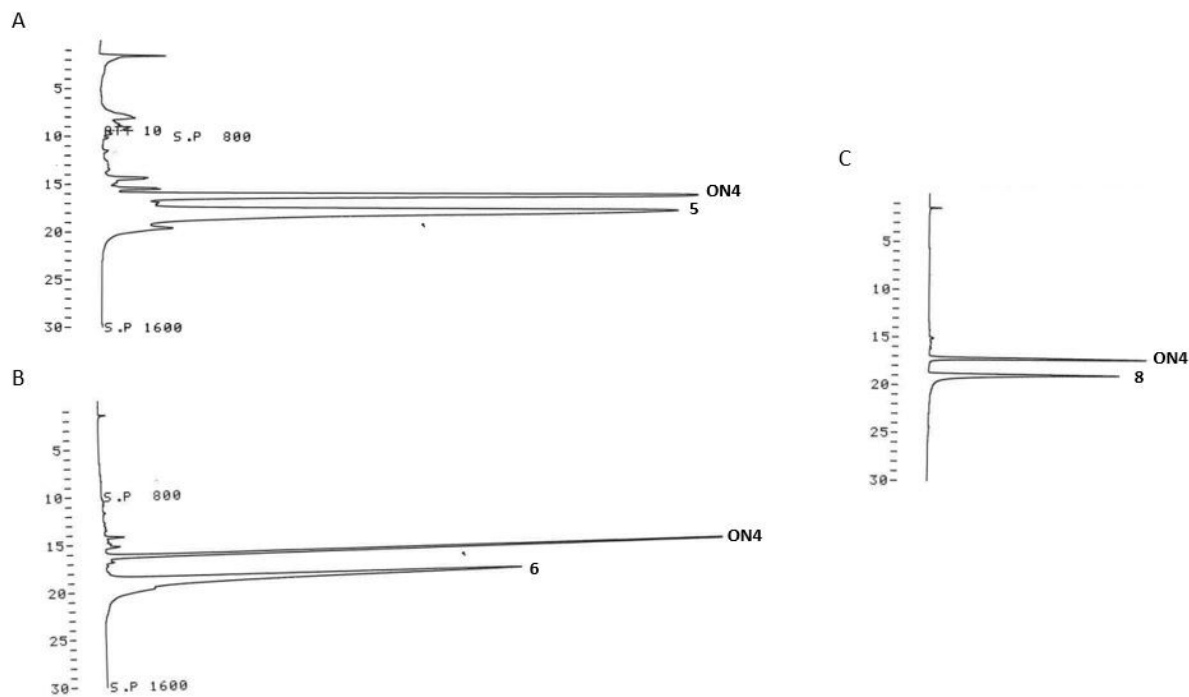


Kuva 3: Monosubstituutiotuotteiden RP-HPLC profiilit. A) [C18]-fullereeniytimen monosubstituutio **ON4**:llä. B) [C18]-fullereeniytimen monosubstituutio **ON5**:llä. C) POSS-ytimen monosubstituutio **ON4**:llä.



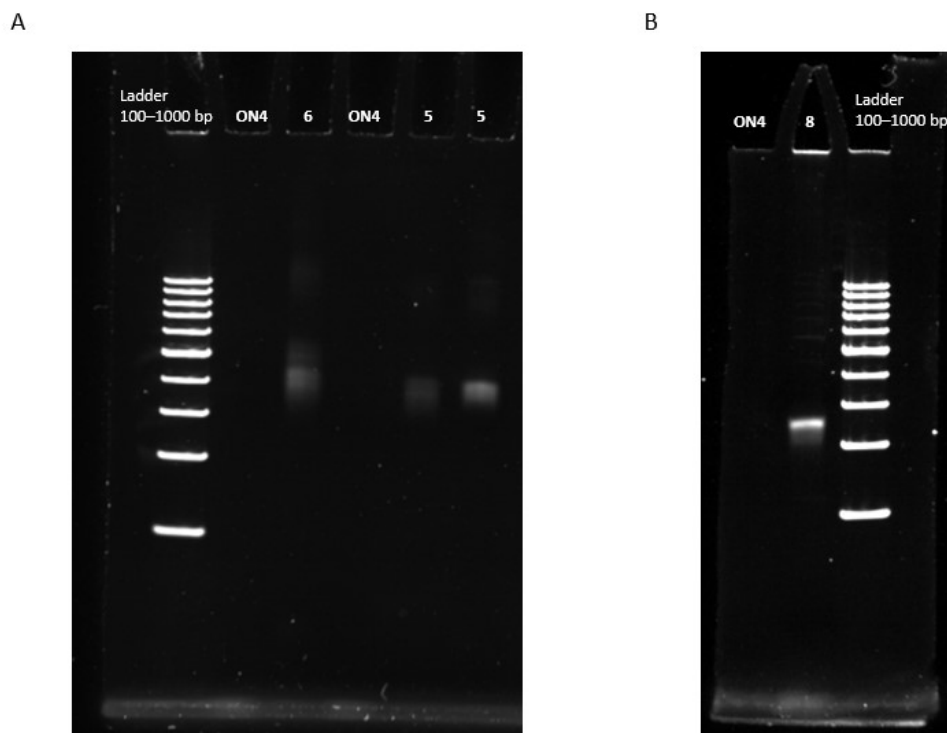
Kuva 4: Monosubstituutiotuotteiden massaspektrit. A) [C18]-fullereeniytimen monosubstituutio **ON4**:llä. B) [C18]-fullereeniytimen monosubstituutio **ON5**:llä. C) POSS-ytimen monosubstituutio **ON4**:llä.

Sense-juosteita sisältävät pallonukleiinihapot puhdistettiin RP-HPLC:llä (Kuva 5). Kukin kolmesta reaktiosta näytti HPLC:n perusteella onnistuneen hyvin. Lähtöaine **ON4** ja pallonukleiinihapot **5**, **6**, ja **8** erottuivat hyvin toisistaan. Pallonukleiinihappojen UV-spektrofotometrisesti määritetyt eristetyt saannot vaihtelivat 28–50 %:n välillä.



Kuva 5: Sense-juosteita sisältävien pallonukleiinihappojen RP-HPLC profiilit. A) [C60]-fullereenipallonukleiinihappo, B) leimallinen [C60]-fullereenipallonukleiinihappo ja C) POSS-pallonukleiinihappo.

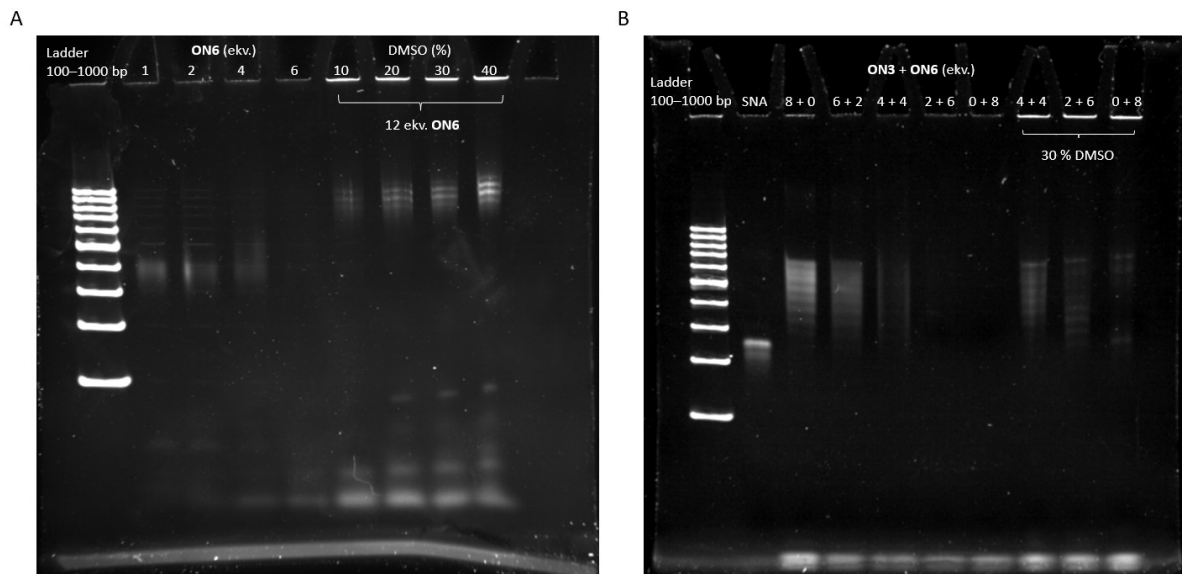
Sense-juosteita sisältävät pallonukleiinihapot analysoitiin vielä PAGE-geelillä (Kuva 6). Geeliltä nähdään, että pallonukleiinihapot on saatu eristettyä hyvin oligonukleotideista, sillä **ON4:n** kohdalla ei havaita pallonukleiinihappojen signaaleita. [C60]-fullereenipallonukleiinihappojen detektoidut signaalit (Kuva 6A) ovat leveitä ja himmeitä. POSS-pallonukleiinihaposta detekoidaan selkeä, kirkas signaali (Kuva 6B). PAGE-analyysin perusteella POSS-pallonukleiinihappo on selvästi [C60]-fullereenipallonukleiinihappoja homogeenisempi.



Kuva 6: Sense-juosteita sisältävien pallonukleiinihappojen PAGE-analysit. A) [C60]-fullereenipallonukleiinihapot. B) POSS-pallonukleiinihapo.

2.3 Hybridisaatiot

Yksi tämän tutkimuksen tavoitteista oli lisätä pallonukleiinihappojen soluun ottoa konjugoimalla niiden vastinjuosteeseen kolesterolia. Alustavissa tutkimuksissa kävi kuitenkin selväksi, että kolesterolin lisääminen häiritsi tuotteiden detektointia PAGE-analysissä. Syynä voi olla tuotteiden osittainen aggregoituminen rasvaliukoisen kolesterolin määrän lisääntyessä. Lopulta sekä leimallisesta [C60]-fullereenipallonukleiinihaposta (6), että POSS-pallonukleiinihaposta (8) päädyttiin tekemään hybridisaatio käyttäen antisense-juosteiden seoksia (ON3 + ON6). Kuten Kuva 7 nähdään, hybridisaation tulos heikkeni kolesterolin määrän eli ON6:n osuuden kasvaessa. Lisäksi havaittiin, että DMSO:n käyttö reaktioissa nosti tuotteiden detektoitavuutta, mutta siitäkin saatava hyöty heikkenee ON6:n määrän kasvaessa, kuten Kuva 7B osoittaa.

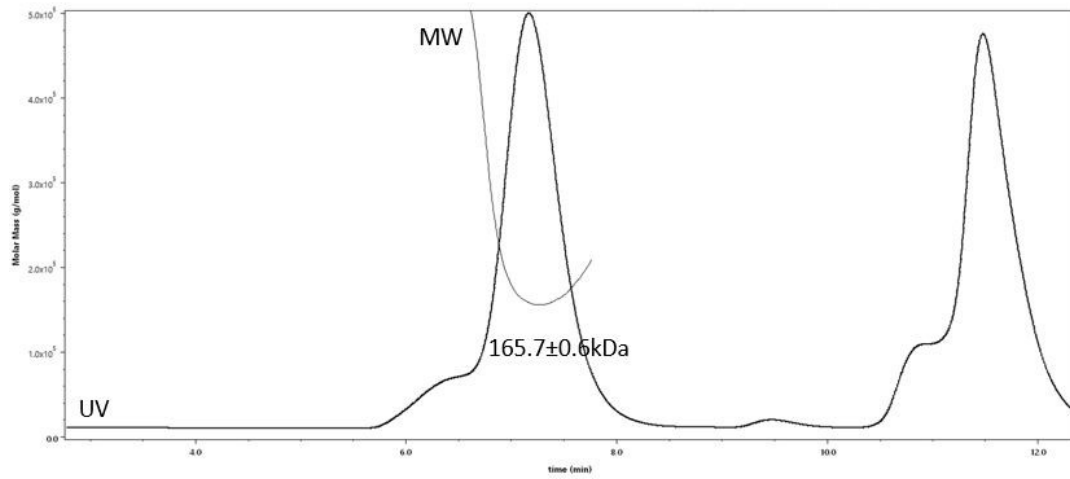


Kuva 7: Pallonukleiinihappojen hybridisaatiot. A) Leimallisen [C60]-fullereenipallonukleiinihapon (**6**) hybridisaatio eri määrillä **ON6**:ta ja eri DMSO-konsentraatioissa. B) POSS-pallonukleiinihapon (**8**) hybridisaatio eri **ON3 + ON6** -seoksilla DMSO:n kanssa ja ilman.

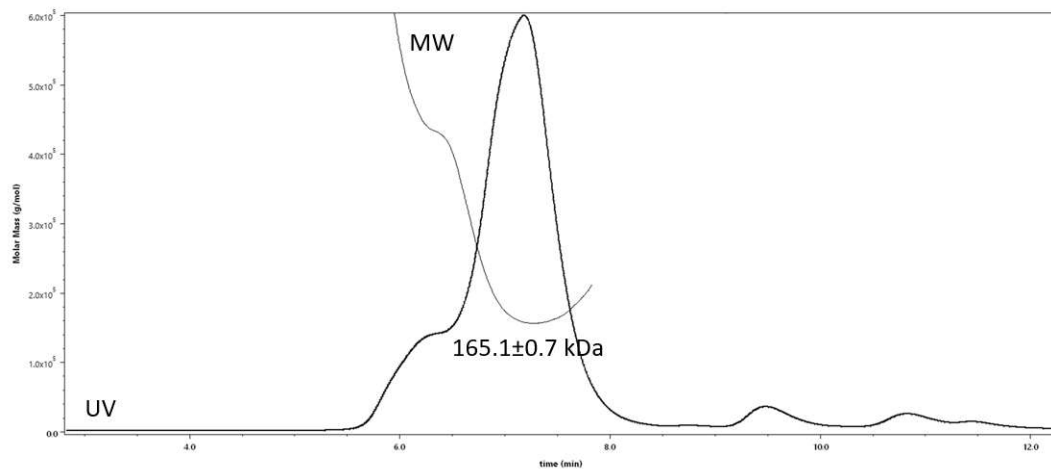
2.4 Karakterisoinnit

2.4.1 SEC-MALS mittaukset

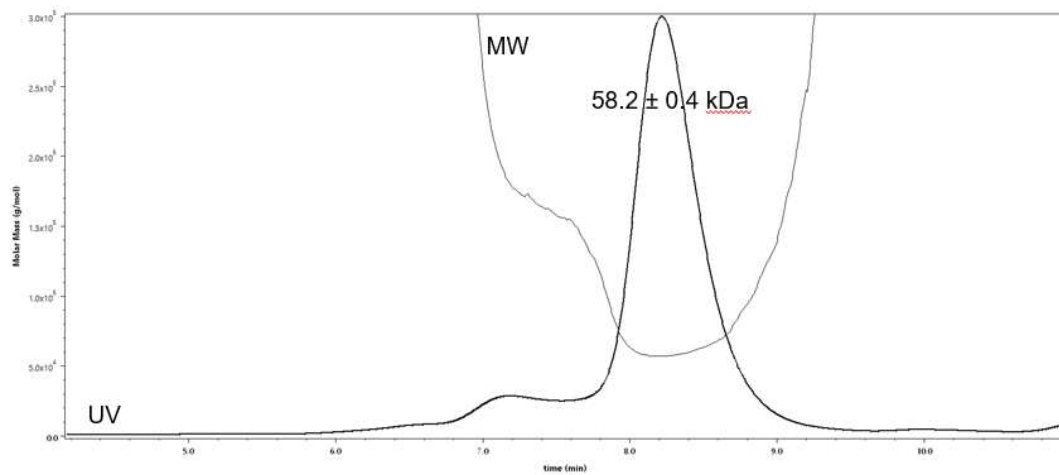
Valmistetut pallonukleiinihapot **5**, **6** ja **8** karakterisoitiin SEC-MALS:lla. Tuotteiden havaitut massat vastasivat kohtalaisen hyvin niiden laskettuja massoja. [C60]-fullereenipallonukleiinihappoilla hybridisoimattomien pallonukleiinihappojen mittaustulokset poikkesivat paljon laskennallisista arvoista, minkä takia ne jätettiin raportoimatta. [C60]-fullereenipallonukleiinihapon **5** hybridisoidun kompleksin (Kuva 8) havaittu: $165,7 \pm 0,6$ kDa, laskettu: 168,4 kDa. Leimallisen [C60]-fullereenipallonukleiinihapon **6** hybridisoidun kompleksin (Kuva 9) havaittu: $165,1 \pm 0,7$ kDa, laskettu: 168,9 kDa. POSS-pallonukleiinihapon **8** ja (Kuva 10) havaittu: $58,2 \pm 0,4$ kDa, laskettu: 58,1 kDa ja **8**:n hybridisoidun kompleksin (Kuva 11) havaittu: $105,2 \pm 0,4$ kDa, laskettu: 113,3 kDa.



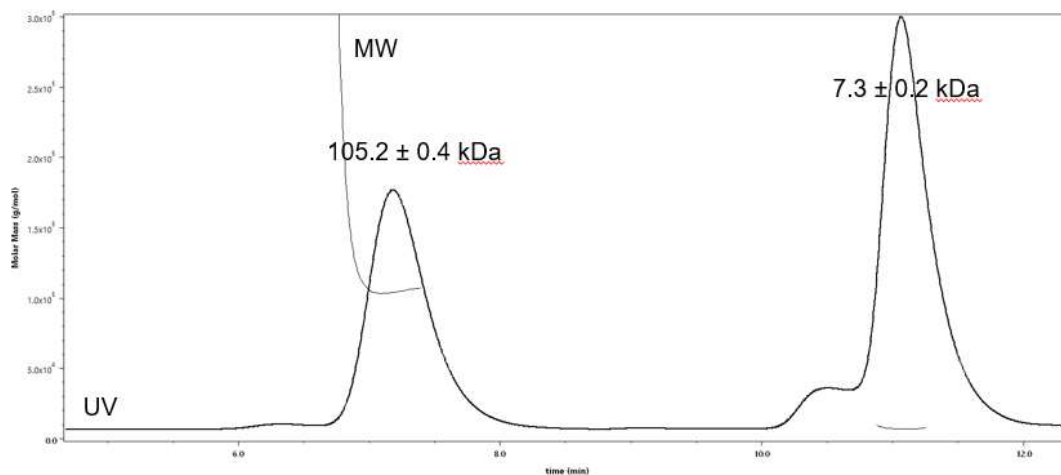
Kuva 8: [C60]-fullereenipallonukleinihapon hybridisoidun kompleksin SEC-MALS-profilii.



Kuva 9: Leimallisen [C60]-fullereenipallonukleinihapon hybridisoidun kompleksin SEC-MALS-profilii.



Kuva 10: POSS-pallonukleinihapon SEC-MALS-profilii.



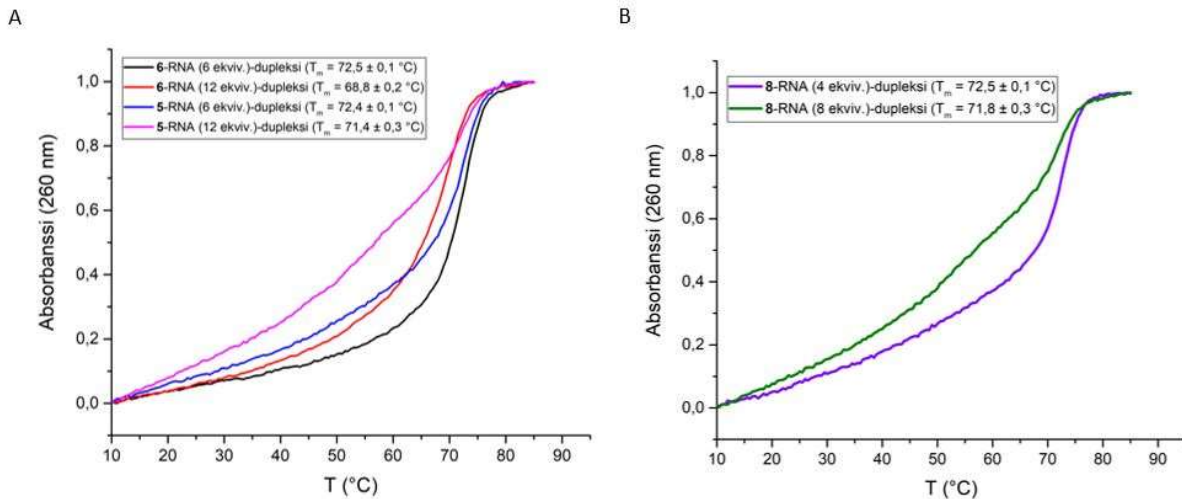
Kuva 11: POSS-pallonukleiinihapon hybridisoidun kompleksin SEC-MALS-profiili.

2.4.2 Sulamislämpötila-analyysit

Valmistettujen pallonukleiinihappojen pysyvyyttä arvioitiin sulamislämpötilamittauksilla. Mittauksissa antisense-juosteen (**ON3**) määrää kasvatettiin asteittain ([C60]-fullereenipallonukleiinihapoilla 3, 6, 9 ja 12 ekv. ja POSS-pallonukleiinihapoilla 2, 4, 6 ja 8 ekv.) Tulosten perusteella voidaan arvioida ja vertailla tehtyjen pallonukleiinihappojen hybridisaatio-ominaisuuksia.

Kuva 12 on esitetty pallonukleiinihappojen osittain ([C60]-pallonukleiinihapoilla 6 ekv. ja POSS-pallonukleiinihapoilla 4 ekv. **ON3**) ja täysin ([C60]-pallonukleiinihapoilla 12 ekv. ja POSS-pallonukleiinihapoilla 8 ekv. **ON3**) hybridisoitujen muotojen sulamiskäyrät. Täysin hybridisoitujen pallonukleiinihappojen käyrät ovat osittain hybridisoitujen käyriä selvästi loivempia. Antisense-juosteiden määrän kasvaessa kaksoiskierteiden välinen repulsio mitä ilmeisimmin lisääntyy, mikä johtaa kaksoiskierteiden pysyvyyden laskuun. Fluoreskeiniileimatulla pallonukeliinihapolla (**6**) repulsio vaikuttaisi olevan pienintä. Ero on kuitenkin sen verran vähäinen, että leiman vaikutuksesta ei voi tehdä johtopäätöksiä. Huolimatta siitä, että POSS-ytimeen kiinnittyy vain 8 juostetta 12 sijaan, tämä näyttää käyttäytyvän kuitenkin hyvin samoin tavoin kuin fullereenivastine (**5**).

Osittain hybridisoiduille pallonukeliinihapoille (**5**, **6** ja **8**) mitatut sulamislämpötilat 72,4 °C, 72,5 °C ja 72,5 °C. Täysin hybridisoiduille pallonukeliinihapoille sulamislämpötilat olivat 71,4 °C, 68,8 °C ja 71,8 °C. Osittain hybridisoitaessa rakenteiden välillä ei siis ole keskenään juurikaan eroa, mutta täysin hybridisoiduista pallonukeliinihapoista leimallinen näyttää olevan muihin verrattuna pysymättömämpi. Keskusrakenteen valinnalla ei näytä olevan suurta vaikutusta rakenteen pysyvyyteen valenssista huolimatta.



Kuva 12: Pallonukleliinihappojen T_m -mittaukset. A) [C60]-fullereenipallonukleliinihapot. B) POSS-pallonukleliinihappo.

2.4.3 DLS-mittaukset

Valmistettujen pallonukleliinihappojen koko määritettiin DLS:llä. Pallonukleliinihapot mitattiin sellaisenaan ja antisense-juosteilla hybridisoituna. Mittauksista saadut pallonukleliinihappojen koot on esitetty Taulukko 1. Fluoreskeiniileimattu [C60]-fullereenipallonukleliinihappo oli leimaamatonta suurempi. Lisäksi hybridisaatio antisense-juosteilla kasvatti pallonukleliinihappojen kokoa. POSS-pallonukleliinihapon kokoa ei saatu määritettyä DLS:llä. DLS:llä saadut arvot perustuvat rakenteiden hydrodynaamiseen kokoon. Lisäksi kukin rakenteista on kooltaan DLS-mittausten luotettavuuden alarajalla.

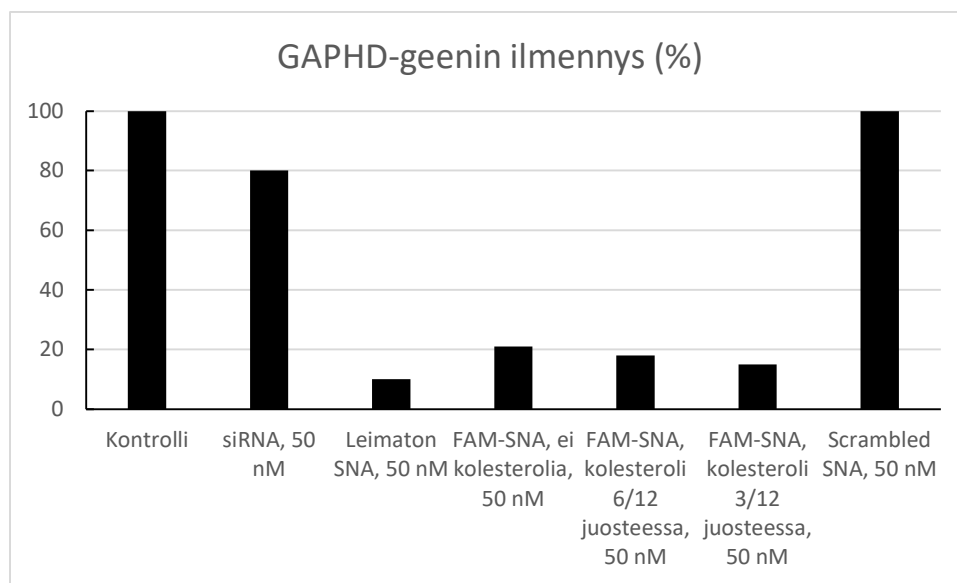
Taulukko 1: Pallonukleliinihapoille DLS:llä määritetyt koot virherajoiheen.

Pallonukleliinihappo	Paljaan pallonukleliinihapon koko (nm)	Hybridisoidun kompleksin koko (nm)
[C60]-fullereenipallonukleliinihappo	$8,0 \pm 1,1$	$14,2 \pm 0,7$
Leimallinen [C60]-fullereenipallonukleliinihappo	$9,6 \pm 1,2$	$15,4 \pm 1,1$

2.5 Solukokeiden tulokset

Leimallista [C60]-fullereenipallonukleliinihappoa (6) lähetettiin Itä-Suomen yliopistoon RPE-solumallissa tutkittavaksi. Haluttiin selvittää, miten pallonukleliinihappo vaikuttaa siRNA:n geenin hiljennyksen tehoon. Kaavio 5 on esitetty solukokeista saadut tulokset.

Transfektioagenssia (RNAiMax) käytettäessä siRNA-pallonukleiinihapot hiljensivät GAPDH-geeniä huomattavasti pelkkää siRNA:ta tehokkaammin. siRNA vähensi geenin ilmennystä noin 20 % ja siRNA-pallonukleiinihappo 80 %. Kokeissa käytettiin samaa efektiivistä siRNA-konsentraatiota, joka oli 50 nM. Fluoreskeiinileiman ja kolesterolikonjugaation vaikutusta siRNA:n geenin ilmennyksen tehoon tutkittiin vertaamalla tuloksia aiemmin toimivaksi osoitettuun leimattomaan [C60]-fullereenipallonukleiinihappoon (5). Tulosten perusteella fluoreskeiinileimaus ja kolesterolikonjugaatio eivät häiritse geenin hiljennystä. Kontrollina käytetty samat emäkset satunnaisessa järjestyksessä sisältävä scrambled-pallonukleiinihappo ei hiljentänyt geenin ilmennystä, mikä osoittaa geenin hiljennyksen olevan sekvenssispesifistä.



Kaavio 5: GAPDH-geenin hiljennys RPE-solumallissa [C60]-fullereenipallonukleiinihapoilla 50 nM:n efektiivisellä siRNA-konsentraatiolla. siRNA = ON4, leimaton SNA = 5 ja FAM-SNA = 6. Kokeessa käytettiin RNAiMax-transfektioagenssia.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

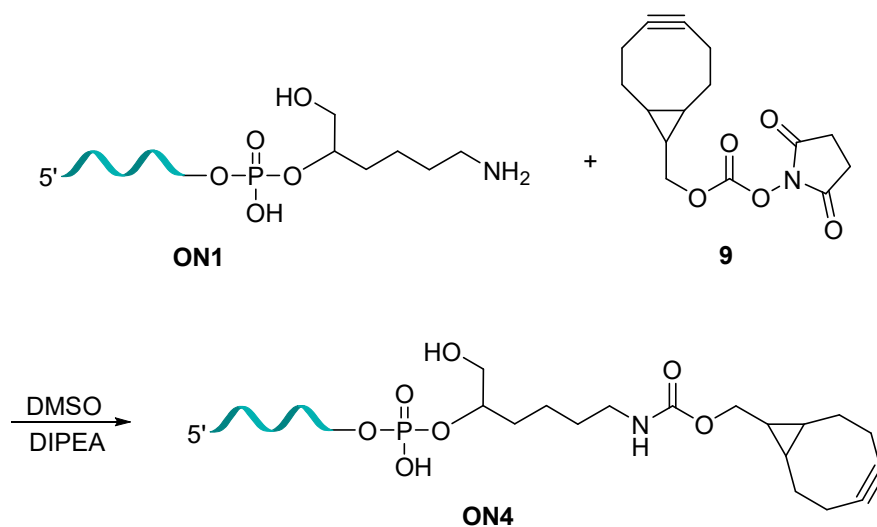
HPLC-puhdistuksissa ja -analyyseissä käytettiin ODS HYPERSIL (250 × 4,6 mm, 5,0 μm) -kolonnia ja 260 nm detektioaallonpituutta, ellei toisin mainita. Pallonukleiinihappojen HPLC-puhdistuksissa ja -analyyseissä käytettiin Aeris WIDEPORE XB-C18 (150 × 4,6 mm, 3,6 μm) -kolonnia ja 260 nm detektioaallonpituutta. Massaspektrit mitattiin Bruker micrO-TOF-Q-massaspektrometrilla, ellei toisin mainita. Oligonukleotidien ja pallonukleiinihappojen saannot määritettiin UV-spektrofotometrisesti Genova Nano (JENWAY) -laitteella aallonpituudella 260 nm.

Geelielektroforeesissa käytettiin 6 % TBE-geelejä, ajoliuoksena 10 % TBE-puskuria ja GeneRuler 100 bp DNA ladderia. Näytteet valmistettiin Hi-Density TBE -näytepuskuriin. Geelit ajettiin Novexin X-Cell SureLock, Mini Gel -ajolaitteistolla (ajoaika 30 min, jännite 200 V, virta 45 mA). Geelejä värjättiin SYBR Gold nukleiinihappogeeliväriin ajopuskuriliuoksessa 15 min ja ne kuvattiin Syngenen geelikameralla.

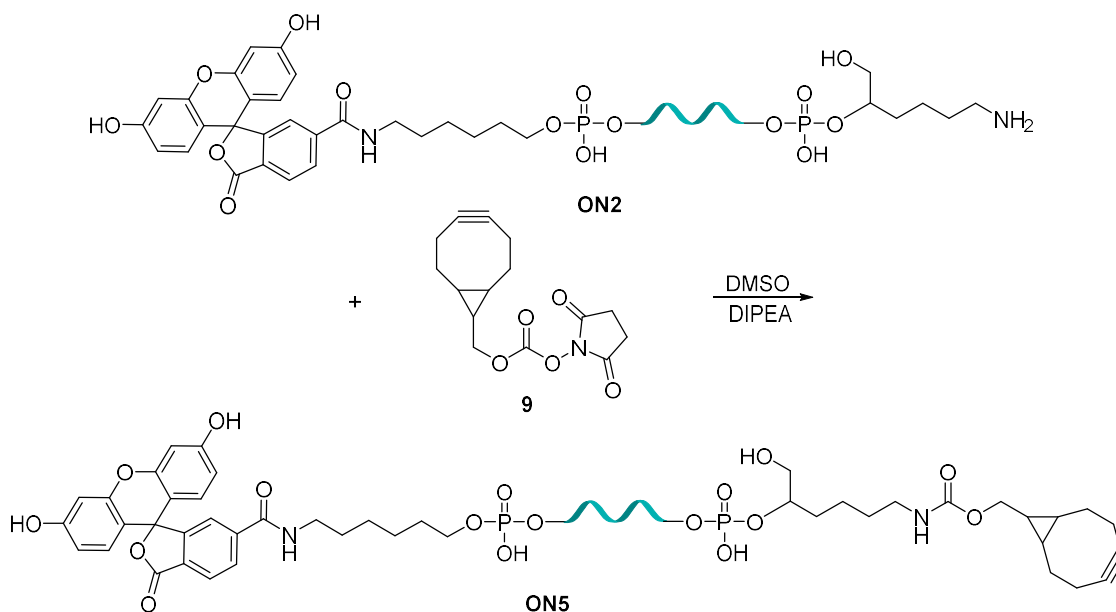
3.2 Oligonukleotidit

Aminomuokatut sense-juosteet (**ON1** ja **ON2**) syntetisoitiin automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla (ÄKTA Oligopilot Plus) kaupallisista fosforamidaattirakenneyksiköistä käyttämällä kiinteää 3'-Amino-Modifier C7 CPG -kantajaa. Antisense-juoste (**ON3**) tilattiin kaupallisesti Metabionilta Saksasta.

3.2.1 BCN:n liittäminen sense-juosteisiin

Kaavio 6: Oligonukleotidin **ON4** synteesi.

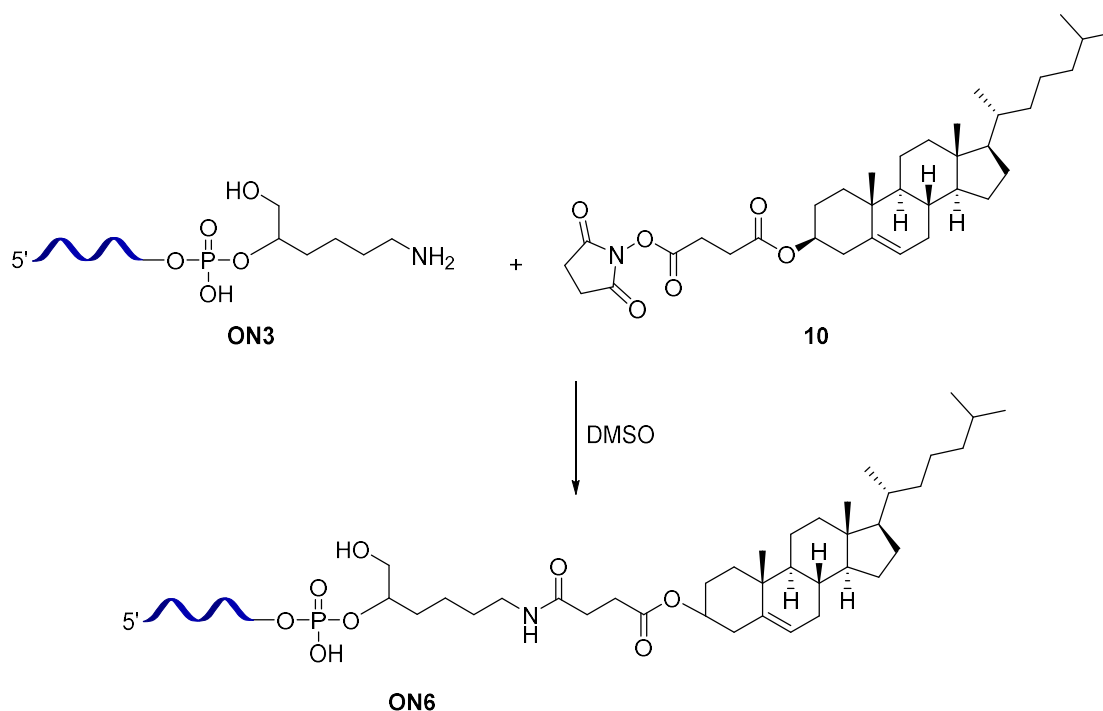
ON1 (120 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännökseen lisättiin BCN-NHS:n (**9**) DMSO-liuosta (6,5 μ l; 1,7 μ mol) ja DIPEA:n DMSO-liuosta (6,5 μ l; 1,7 μ mol). Liuokseen lisättiin 5,0 μ l DMSO:a ja sitä lämmitettiin hetki uunissa 55 °C:ssa, jolloin kaikki **ON1** liukeni. Reaktion annettiin edetä 2 h huoneenlämmössä. Reaktion etenemistä seurattiin HPLC:llä ja saannon parantamiseksi reaktioseokseen lisättiin vielä BCN-NHS ja DIPEA-liuoksia (kumpaakin 2,0 μ l, 0,4 μ mol). Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1,0 ml/min). Eristetyn tuotteen (**ON4**) saannoksi määritettiin 58 nmol (49 %). ESI-MS: m/z : 774,155 [M-9H]⁹⁻ (havaittu); 774,157 [M-9H]⁹⁻ (laskettu).



Kaavio 7: Oligonukleotidin **ON5** synteesi.

ON2 (39 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin (**9**):n DMSO-liuosta (2,9 µl; 590 nmol) ja DIPEA:n M DMSO-liuosta (2,9 µl; 590 nmol). Liuokseen lisättiin 4,2 µl DMSO:a, jolloin kaikki **ON2** liukeni. Reaktioon annettiin edetä 2 h huoneenlämmössä. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1,0 ml/ min). Eristetyn tuotteen (**ON5**) saannoksi määritettiin 18 nmol (48 %). ESI-MS: m/z : 938,161 [M-8H]⁸⁻ (havaittu); 938,301 [M-8H]⁸⁻ (laskettu).

3.2.2 Kolesterolin liittäminen antisense-juosteeseen



Kaavio 8: Oligonukleotidin **ON6** synteesi.

ON3 (25 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin kolesteroli-NHS:n (**10**) ksyleeni-liuosta (3,8 μ l; 380 nmol). Liuokseen lisättiin vielä 6,3 μ l DMSO:a, jolloin kaikki **ON3** liukeni. Reaktioon annettiin edetä 2 h huoneenlämmössä. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (0–70 % ACN 25 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1 ml/min). Eristetyn tuotteen (**ON6**) saannoksi määritettiin 16 nmol (65 %). ESI-MS: m/z : 1052,235 $[M-7H]^{7-}$ (havaittu); 1052,143 $[M-7H]^{7-}$ (laskettu).

3.3 Monosubstituoitujen oligonukleotidi-keskusrakennekonjugaattien synteesi

3.3.1 Oligonukleotidi-[C60]-fullereenikonjugaatit.

ON4 (109 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin DMSO:iin liuotettu **1** (109 μ l; 330 nmol). Liuokseen lisättiin vielä 620 μ l DMSO:a, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 730 μ l. Reaktioon annettiin edetä 24 h huoneenlämmössä. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä [40–100 % ACN 20 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, Clarity Oligo-RP (250 \times 10 mm, 5,0 μ m) -kolonni, virtausnopeus 3,0

ml/min]. Eristetyn tuotteen (3) saannoksi määritettiin 29,0 nmol (26 %). ESI-MS: m/z : 10722,626 [M-11H]¹¹⁻ (havaittu); 10724,052 [M-11H]¹¹⁻ (laskettu).

ON5:n vesiliuos (68 μ l; 70 nmol) ja DMSO:iin liotettu **1** (70 μ l; 210 nmol) yhdistettiin mikrosentrifugiputkessa. Liuokseen lisättiin vielä 780 μ l DMSO:a, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 920 μ l. Reaktioon annettiin edetä 24 h huoneenlämmössä. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä [40–100 % ACN 20 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, Clarity Oligo-RP (250 \times 10 mm, 5,0 μ m) -kolonni, virtausnopeus 3,0 ml/min]. Eristetyn tuotteen (4) saannoksi määritettiin 31 nmol (44 %). ESI-MS: m/z : 11260,305 [M-11H]¹¹⁻ (havaittu); 11262,052 [M-11H]¹¹⁻ (laskettu).

3.3.2 Oligonukleotidi-POSS-konjugaatti

ON4:n vesiliuos (17,0 μ l; 20 nmol) ja DMSO:iin liotettu **2** (20 μ l; 100 nmol) yhdistettiin mikrosentrifugiputkessa. Liuokseen lisättiin vielä 78 μ l DMSO:a, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 120 μ l. Reaktioon annettiin edetä 24 h huoneenlämmössä. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (5–60 % ACN 30 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1,0 ml/min). Eristetyn tuotteen (7) saannoksi määritettiin 12 nmol (60 %). Tuotteen massaspektri mitattiin Waters RDa -massaspektrometrillä. ESI-MS: m/z : 2305,357 [M-4H]⁴⁻ (havaittu); 2305,790 [M-4H]⁴⁻ (laskettu).

3.4 Pallonukleinihappojen synteesi

3.4.1 [C60]-fullereenipallonukleinihapot

ON4 (190 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin veteen liotettu **3** (36 μ l; 11 nmol). 0,75 M suolakonsentraation saavuttamiseksi liuokseen lisättiin 7,2 μ l natriumkloridin 4,5 M vesiliuosta. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 72 h. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (5–45 % ACN, 30 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1 ml/min). Eristetyn tuotteen (5) saannoksi määritettiin 5,4 nmol (50 %). HPLC-puhdistuksesta kerätyt oligonukleotidi- ja tuotefraktiot, analysoitiin geelielektroforeesilla.

ON4 (190 nmol) kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin veteen liotettu **4** (72 μ l; 11 nmol). 0,75 M suolakonsentraation saavuttamiseksi

liuokseen lisättiin 14 μl natriumkloridin 4,5 M vesiliuosta. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 72 h. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (5–45 % ACN, 30 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1 ml/ min). Eristetyn tuotteen (**6**) saannoksi määritettiin 3,1 nmol (28 %). HPLC-puhdistuksesta kerätyt oligonukleotidi- ja tuotefraktiot, analysoitiin geielektroforeesilla.

3.4.2 POSS-pallonukleiinihappo

ON 4:n vesiliuos (120 μl ; 140 nmol) ja **7:n** vesiliuos (29 μl ; 12 nmol) yhdistettiin mikrosentrifugiputkessa. 0,75 M suolakonsentraation saavuttamiseksi liuokseen lisättiin 29 μl natriumkloridin 4,5 M vesiliuosta. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 72 h. Reaktioseos puhdistettiin HPLC:llä (5–45 % ACN, 30 min, 50 mM TEAA-puskuri, pH = 7,0, virtausnopeus 1 ml/ min). Eristetyn tuotteen (**8**) saannoksi määritettiin 3,5 nmol (30 %). HPLC-puhdistuksesta kerätyt oligonukleotidi- ja tuotefraktiot analysoitiin geielektroforeesilla.

3.5 Pallonukleiinihappojen hybridisaatio

3.5.1 Leimallinen [C60]-fullereeni-pallonukleiinihappo

Leimallista [C60]-fullereeni-pallonukleiinihappoa (**6**) hybridisoitiin kolesterolikonjugoidun antisense-juosteen (**ON6**) kanssa PBS:ssä tai 10–40 % DMSO:n PBS-liuoksessa. Näyttemateriaalit kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen ja haihdutusjäännökset liuotettiin Taulukko 2 mukaisiin määriin PBS:ää ja DMSO:a. Hi-Density TBE -näytepuskuri (2 μl) lisättiin näytteisiin. Näytteet analysoitiin geielektroforeesilla.

Taulukko 2: Leimallisen [C60]-fullereeni-pallonukleiinihapon (**6**) hybridisaatioreaktioiden valmistus.

Näyte	n(6)	n(ON6)	v(PBS)	v(DMSO)
1 ekv	5 pmol	5 pmol	8 μl	-
2 ekv	5 pmol	10 pmol	8 μl	-
4 ekv	5 pmol	20 pmol	8 μl	-
6 ekv	5 pmol	30 pmol	8 μl	-
10 % DMSO	5 pmol	60 pmol	7 μl	1 μl
20 % DMSO	5 pmol	60 pmol	6 μl	2 μl
30 % DMSO	5 pmol	60 pmol	5 μl	3 μl
40 % DMSO	5 pmol	60 pmol	4 μl	4 μl

3.5.2 POSS-pallonukleiinihappo

POSS-pallonukleiinihappoa (**8**) hybridisoitiin antisense-juosteen (**ON3**) ja sen kolesterolikonjugaatin (**ON6**) seoksilla PBS:ssä ja 30 % DMSO/ PBS:ssä. Näyttemateriaalit kylmäkuivattiin mikrosentrifugiputkeen ja haihdutusjäännökset liuotettiin Taulukko 3 mukaisiin määriin PBS:ää ja DMSO:a. Hi-Density TBE -näytepuskuri (2 µl) lisättiin näytteisiin. Näytteet analysoitiin geelielektroforeesilla.

Taulukko 3: POSS-pallonukleiinihapon (**8**) hybridisaatioreaktioiden valmistus.

Näyte	n(8)	n(ON3)	n(ON6)	V(PBS)	V(DMSO)
SNA	5 pmol	0 pmol	0 pmol	8 µl	-
8:0	5 pmol	40 pmol	0 pmol	8 µl	-
6:2	5 pmol	30 pmol	10 pmol	8 µl	-
4:4	5 pmol	20 pmol	20 pmol	8 µl	-
2:6	5 pmol	10 pmol	30 pmol	8 µl	-
0:8	5 pmol	0 pmol	40 pmol	8 µl	-
4:4, 30 % DMSO	5 pmol	20 pmol	20 pmol	5 µl	3 µl
2:6, 30 % DMSO	5 pmol	10 pmol	30 pmol	5 µl	3µl
0:8, 30 % DMSO	5 pmol	0 pmol	40 pmol	5 µl	3 µl

3.6 Pallonukleiinihappojen karakterisointi

3.6.1 SEC-MALS mittaukset

SEC-MALS mittaukset tehtiin 1260 Infinity II HPLC (Agilent Technologies) -laitteistolla. MiniDAWN (Wyatt Technologies) -valonsirontadetektoria ja Optilab (Wyatt Technologies) -taitekerroindetektoria käytettiin MALS ja taitekerroin (RI) -signaalien määrittämiseksi. Näytteet mitattiin AdvanceBio SEC 300 Å 2,7 µm 4,6 x 300 mm (Agilent Technologies) -kyveteissä. Liikkuvana faasina käytettiin 150 mM natriumfosfaattia, pH 7,0, ja sitä virtautettiin 20 min 0,2 ml/min virtausnopeudella.

Mittauksia varten pallonukleiinihappoista ja niiden hybridisoiduista komplekseista valmistettiin nukleaasivapaaseen veteen näytteet, joiden konsentraatio oli 0,5 µg/µl. Hybridisoiduissa komplekseissa käytettiin 12 ekv. kolesterolikonjugoimatonta antisense-juostetta (**ON3**) pallonukleiinihappoille **5** ja **6** ja 8 ekv. pallonukleiinihapolle **8**. Liuoksia injektoidiin analyysijä varten 40 µl. Näytteiden moolimassat laskettiin MALS ja RI-signaalien pohjalta käyttämällä taitekertoimen lisäyksenä (dn/dc) 0,1703 ml/g.

3.6.2 Sulamislämpötila-analyysit

Pallonukleinihappo–antisense-juostekompleksien sulamislämpötilat ja -käyrät määritettiin lämmittämällä näytteitä Ptp 6 + 6 Peltier Temperature Programmer (PerkinElmer) -laitteistolla ja mittaamalla UV-absorbanssi Lambda 35 UV/VIS (PerkinElmer) -spektrometrillä. Näytteitä lämmitettiin laitteessa (10–85 °C; 0,5 °C/ min) ja niiden UV-absorbanssi mitattiin 0,5 asteen välein aallonpituudella 260 nm. Sulamislämpötilat määritettiin sulamiskäyrän ensimmäisen derivaatan maksimiarvosta (kolmen lämmitys- ja jäähtyysyksen keskiarvo). Mittauksia varten pallonukleinihappoista valmistettiin 0,1 µM näytteet natriumkakodylaattipuskuriin (10 mM; pH 7,0; 0,1 M NaCl). Näytteet mitattiin High Precision Cell, 10 mm Light Path (Hellma Analytics) -kyveteissä. Mittauksissa käytettiin titrausmenetelmää, jossa antisense-juosteen (**ON3**) määrää nostettiin asteittain Taulukko 4 mukaisesti.

Taulukko 4 Sulamislämpötilamittauksissa käytetyn antisense-juosteen (**ON3**) määrät.

Pallonukleinihappo	Mittaus 1	Mittaus 2	Mittaus 3	Mittaus 4
[C60]-fullereenipallonukleinihappo (5)	3 ekv.	6 ekv.	9 ekv.	12 ekv.
Leimallinen [C60]-fullereenipallonukleinihappo (6)	3 ekv.	6 ekv.	9 ekv.	12 ekv.
POSS-pallonukleinihappo (8)	2 ekv.	4 ekv.	6 ekv.	8 ekv.

3.6.3 DLS-mittaukset

Valmistettujen pallonukleinihappojen koko mitattiin Zetasizer Nano ZS80 (Malvern Instruments) -laitteella. Mittauksissa käytettiin seuraavia asetuksia ja olosuhteita: materiaalina proteiini (RI 1,450; absorptio 0,001), liuottimena vesi (viskositeetti 0,8872 cP; RI 1,330), lämpötila 25°C ja tasapainotusaika 120 s. Näytteet valmistettiin PBS:ään (20 pmol pallonukleinihappoa ja 100 µl:ssa PBS:ää). Hybridisoiduissa komplekseissa käytettiin 12 ekv. kolesterolikonjugoimatonta antisense-juostetta (**ON3**) pallonukleinihappoille **5** ja **6** ja 8 ekv. pallonukleinihapolle **8**. Jokainen näyte mitattiin kuusi kertaa ja tulokseksi ilmoitettiin mittausten keskiarvo.

3.7 Solukokeet Itä-Suomen yliopistolla

Leimallista pallonukleiinihappoa **6** lähetettiin Itä-Suomen yliopistoon RPE-soluissa tutkittavaksi. Pallonukleiinihaposta tehtiin kolme näytettä, joissa kolesterolikonjugoidun antisense-juosteen **ON6** määrä suhteessa konjugoimattomaan antisense-juosteeseen **ON3** vaihteli seuraavasti: 0 + 12 ekv., 3 + 9 ekv. ja 6 + 6 ekv. Kontrolliksi tutkimuksiin lähetettiin samoista emäksistä tehdystä toimimattomasta sekvenssistä valmistettu scrambled-pallonukleiinihappo, joka hybridisoitiin komplementaarisella scrambled-vastinjuosteella, johon ei ollut konjugoitu kolesterolia. 100 μ M näytteet valmistettiin 12 μ l:aan PBS:ää. Itse solukokeissa efektiivinen siRNA-konsentraatio oli 50 nM.

4 Johtopäätökset ja yhteenveto

Kaikki halutut pallonukleiinihapot onnistuttiin valmistamaan. Eri työvaiheissa käytetyt puhdistus- ja karakterisointimenetelmät soveltuivat tehdyille reaktioille. Jokaista työvaihetta pystyttiin seuraamaan HPLC:llä ja tuotteet erottuivat hyvin lähtöaineista ja mahdollisista sivutuotteista. Muokattujen RNA-juosteiden ja tehtyjen monosubstituutiotuotteiden moolimassat saatiin mitattua massaspektrometrilla. Valmiiden pallonukleiinihappojen PAGE-analyseissä varmistuttiin tuotteiden homogeenisuudesta. Lisäksi SEC-MALS:lla mitatut moolimassat vastasivat hyvin laskennallisia massoja ja tehdyt sulamislämpötilamittaukset noudattelivat aiemmin saatuja tuloksia. DLS-mittaukset onnistuivat [C60]-fullereenipallonukleiinihappoilla, mutta POSS-pallonukleiinihappoja ei onnistuttu mittaamaan. Mittausten epäonnistuminen voisi johtua kohteena olevien pallonukleiinihappojen liian pienestä koosta sekä niiden osittaisesta aggregoitumistaipumuksesta. Ylipäättään DLS-mittauksilla saadut tulokset näin pienillä partikkeleilla eivät välttämättä ole luotettavia.

Alustavissa tutkimuksissa havaittiin, että pallonukleiinihappojen hybridisointi kolesterolikonjugoiduilla antisense-juosteilla johti mitä ilmeisimmin pallonukleiinihappojen aggregoitumiseen. Tätä pystyttiin havainnoimaan PAGE:lla, jossa nähtiin selkeä korrelaatio rasvaliukoisen kolesterolin määrän kasvaessa. Oligonukleotideja väljemmin pakkaavaa POSS-ydintä kokeiltiin myös ratkaisuna ongelmaan, mutta saadut tulokset olivat samanlaisia kuin [C60]-fullereenin kanssa.

POSS-ydin näyttäisi olevan kuitenkin muilta ominaisuuksiltaan [C60]-fullereenia parempi keskusrakenne. HPLC:llä mono- ja täyssubstituutioreaktiot näyttivät siistimmiltä ja PAGE-geelijaio osoitti POSS-pallonukleiinihapon olevan paljon [C60]-fullereenipallonukleiinihappoa homogeenisempää. Sulamislämpötiloissa ja siten rakenteiden pysyvyydessä ei ollut eroa POSS- ja [C60]-fullereenikeskusrakenteiden välillä. [C60]-fullereenin valmistus vaatii raakaöljyä ja siksi ympäristöystävällisempi ja paremmin toimiva POSS-ydin voisikin olla sille hyvä korvaaja. Lisäksi POSS on myös biohajoava ja bioyhteensopiva.

Itä-Suomen yliopistossa [C60]-fullereenipallonukleiinihappoilla tehdyt solukokeet vahvistivat hypoteesin pallonukleiinihappojen eduista *in vitro*. Kokeissa 50 nM:n efektiivisellä siRNA-konsentraatiolla GAPDH-geenin hiljennys oli huomattavasti paljasta siRNA:ta suurempi, kun siRNA annostettiin soluille [C60]-fullereenipallonukleiinihapoksi pakattuna. Fluoreskeiinileima ja antisense-juosteen kolesterolikonjugaatio eivät myöskään häirinneet

geenin hiljennystä. Tulos on lupaava, sillä monoleimaus helpottaa pallonukleiinihappojen jatkotutkimuksia ja kolesterolikonjugaatiosta voisi olla hyötyä jatkossa pallonukleiinihappojen pakkaamisessa solunulkoisiin vesikkeleihin. Sittenmin Itä-Suomen yliopistosta saatiin vastaavanlaisia solukoetuloksia myös POSS-pallonukleiinihapoilla.

Tässä tutkimuksessa osoitettiin pallonukleiinihappojen sopivuus GAPDH-siRNA:n solukuljettimeksi. Lisäksi POSS-ydin voisi olla tulevaisuudessa [C60]-fullereeniytimen vihreämpi vaihtoehto. Jatkossa tutkitaan vielä kolesterolikonjugoitujen pallonukleiinihappojen pakkaamista solunulkoisiin vesikkeleihin. Lisätutkimuksia tarvitaan vielä myös kolesterolikonjugoitujen pallonukleiinihappojen aggregaatio-ongelman ratkaisemiseksi. Tässä työssä saadut lupaavat tulokset ovat merkittäviä, sillä niiden myötä ollaan taas askelen lähempänä hoitomuotoa kuivaan silmänpohjan ikärappeumaan, joka ei vielä ole hoidettavissa.

Lähteet

1. V. K. Sharma, P. Rungta, A. K. Prasad, Nucleic acid therapeutics: Basic concepts and recent developments. *RSC Adv.* **4**, 16618–16631 (2014).
2. V. K. Sharma, J. K. Watts, Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med. Chem.* **7**, 2221–2242 (2015).
3. M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 285–288 (1978).
4. G. F. Deleavey, M. J. Damha, Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem. Biol.* **19**, 937–954 (2012).
5. A. Curreri, D. Sankholkar, S. Mitragotri, Z. Zhao, RNA therapeutics in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **8**, 1–19 (2023).
6. S. L. Hutcherson, R. Lanz, A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with aids. *Am. J. Ophthalmol.* **133**, 467–474 (2002).
7. S. T. Crooke, R. S. Geary, Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **76**, 269–276 (2013).
8. C. A. Chiriboga, *et al.*, Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN Rx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* **86**, 890–897 (2016).
9. K. R. Q. Lim, R. Maruyama, T. Yokota, Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 533–545 (2017).
10. D. E. Frank, *et al.*, Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **94**, 2270–2282 (2020).
11. R. R. Roshmi, T. Yokota, Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs of Today* **55**, 627–639 (2019).
12. M. Shirley, Casimersen: First Approval. *Drugs* **81**, 875–879 (2021).

13. L. Gales, Tegsedi (Inotersen): An Antisense Oligonucleotide Approved for the Treatment of Adult Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Pharmaceuticals* **12**, 10–15 (2019).
14. J. Kim, *et al.*, Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1644–1652 (2019).
15. O. Esan, A. S. Wierzbicki, Volanesorsen in the treatment of familial chylomicronemia syndrome or hypertriglyceridaemia: Design, development and place in therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* **14**, 2623–2636 (2020).
16. A. V. Kristen, *et al.*, Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener. Dis. Manag.* **9**, 5–23 (2019).
17. Y. Y. Syed, Givosiran: A Review in Acute Hepatic Porphyria. *Drugs* **81**, 841–848 (2021).
18. S. F. Garrelfs, *et al.*, Lumasiran, an RNAi Therapeutic for Primary Hyperoxaluria Type 1. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1216–1226 (2021).
19. F. J. Raal, *et al.*, Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1520–1530 (2020).
20. V. Oberhardt, *et al.*, Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Nature* **597**, 268–273 (2021).
21. S. A. Vinores, Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 263–268 (2006).
22. K. Xue, R. E. MacLaren, Antisense oligonucleotide therapeutics in clinical trials for the treatment of inherited retinal diseases. *Expert Opin. Investig. Drugs* **29**, 1163–1170 (2020).
23. J. L. Katzmann, C. J. Packard, M. J. Chapman, I. Katzmann, U. Laufs, Targeting RNA With Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNA in Dyslipidemias. *J. Am. Coll. Cardiol.* **76**, 563–579 (2020).
24. R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, reviews Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA. *Mol. Pharm.* **6**, 686–695 (2009).

25. X. Ming, B. Laing, Bioconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 81–89 (2015).
26. P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N. K. Jain, A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials* **33**, 7138–7150 (2012).
27. K. A. Whitehead, J. E. Dahlman, R. S. Langer, D. G. Anderson, Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**, 77–96 (2011).
28. H. Li, *et al.*, Molecular spherical nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4340–4344 (2018).
29. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **382**, 607–609 (1996).
30. M. S. Han, C. A. Mirkin, Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science (80-.)*. **312**, 1027–1030 (2006).
31. J. I. Cutler, E. Auyeung, C. A. Mirkin, Spherical nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1376–1391 (2012).
32. I. A. Quintela, B. G. De Los Reyes, C. S. Lin, V. C. H. Wu, Simultaneous direct detection of Shiga-toxin producing Escherichia coli (STEC) strains by optical biosensing with oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Nanoscale* **7**, 2417–2426 (2015).
33. S. R. Wilson, *et al.*, Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: Observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial. *Am. Heart J.* **158**, 386–391 (2009).
34. G. F. Paciotti, D. G. I. Kingston, L. Tamarkin, Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors. *Drug Dev. Res.* **67**, 47–54 (2006).
35. D. Zheng, *et al.*, Topical delivery of siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11975–11980 (2012).

36. J. S. Lee, A. K. R. Lytton-Jean, S. J. Hurst, C. A. Mirkin, Silver nanoparticle - Oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties. *Nano Lett.* **7**, 2112–2115 (2007).
37. G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8122–8123 (1999).
38. J. I. Cutler, D. Zheng, X. Xu, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, Polyvalent oligonucleotide iron oxide nanoparticle “click” conjugates. *Nano Lett.* **10**, 1477–1480 (2010).
39. K. L. Young, *et al.*, Hollow spherical nucleic acids for intracellular gene regulation based upon biocompatible silica shells. *Nano Lett.* **12**, 3867–3871 (2012).
40. R. J. Banga, N. Chernyak, S. P. Narayan, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, Liposomal spherical nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9866–9869 (2014).
41. Z. Li, Y. Zhang, P. Fullhart, C. A. Mirkin, Reversible and chemically programmable micelle assembly with DNA block-copolymer amphiphiles. *Nano Lett.* **4**, 1055–1058 (2004).
42. J. D. Brodin, A. J. Sprangers, J. R. McMillan, C. A. Mirkin, DNA-Mediated Cellular Delivery of Functional Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 14838–14841 (2015).
43. V. Gulumkar, *et al.*, Controlled Monofunctionalization of Molecular Spherical Nucleic Acids on a Buckminster Fullerene Core. *Bioconjug. Chem.* **32**, 1130–1138 (2021).
44. D. A. Giljohann, *et al.*, Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. *Nano Lett.* **7**, 3818–3821 (2007).
45. P. C. Patel, *et al.*, Scavenger Receptors Mediate Cellular Uptake of Polyvalent Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **21**, 2250–2256 (2010).
46. C. H. J. Choi, L. Hao, S. P. Narayan, E. Auyeung, C. A. Mirkin, Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7625–7630 (2013).
47. D. A. Giljohann, D. S. Seferos, A. E. Prigodich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, Gene

- regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2072–2073 (2009).
48. S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J.* **7** (2005).
 49. S. A. Jensen, *et al.*, Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates as an RNAi-Based Therapy for Glioblastoma. **5** (2014).
 50. P. S. Randeria, *et al.*, 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).
 51. G. Yamankurt, *et al.*, The effector mechanism of siRNA spherical nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 1312–1320 (2020).
 52. W. L. Wong, *et al.*, Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* **2**, 106–116 (2014).
 53. C. J. Thomas, R. G. Mirza, M. K. Gill, Age-Related Macular Degeneration. *Med. Clin. North Am.* **105**, 473–491 (2021).
 54. A. Stahl, The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Dtsch. Arztebl. Int.* **117**, 513–520 (2020).
 55. N. Kivinen, A. Koskela, A. Kauppinen, K. Kaarniranta, Silmänpohjan ikärappeuman patogeenesi-autofagian ja inflammasomien vuoropuhelua. *Duodecim* **133**, 641–646 (2017).
 56. E. Ramsay, *et al.*, Avoiding the Pitfalls of siRNA Delivery to the Retinal Pigment Epithelium with Physiologically Relevant Cell Models. *Pharmaceutics* **12** (2020).
 57. D. M. Chuang, C. Hough, V. V. Senatorov, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 269–290 (2005).
 58. M. K. Nielsen, *et al.*, Systemic levels of interleukin-6 correlate with progression rate of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Investig.*

Ophthalmol. Vis. Sci. **60**, 202–208 (2019).