

Silsekvioksaaniin perustuva organonanotsyymi

Bio-organisen kemian
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Iris Tuomi

10.12.2025
Turku

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

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Bio-orgaaninen kemia

Tekijä: Iris Tuomi

Otsikko: Silseskvioksaaniin perustuva organonanotsyymi

Ohjaajat: Hanni Haapsaari ja Pasi Virta

Sivumäärä: 42 sivua + liitteet 17 sivua

Päivämäärä: 10.12.2025

Epänormaali geenien säätely voi johtaa sairauksien syntyyn. Perinteisillä terapeuttisilla menetelmillä tällaisiin sairauksiin vaikutetaan patogeenisten proteiinien tasolla. Näillä menetelmillä on kuitenkin useita haasteita, minkä vuoksi katalyyttinen, sekvenssispesifinen vaikuttaminen RNA-tasolla on osoittautunut potentiaaliseksi vaihtoehdoksi perinteisille, esimerkiksi pienmolekulaarisiin lääkkeisiin perustuville, menetelmille. Tällä hetkellä laajimmin tutkitut terapeuttiset menetelmät sekvenssispesifiseen vaikuttamiseen RNA-tasolla ovat antisense-oligonukleotidit sekä pienet häiritsevät RNA:t eli siRNA:t, mutta niiden terapeuttiseen käyttöön liittyvien haasteiden vuoksi keinotekoiset ribonukleaasit ovat osoittautuneet hyvinkin potentiaaliseksi vaihtoehdoksi.

Keinotekoiset ribonukleaasit katalysoivat RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolyysiä eli ne kykenevät pilkkomaan kohde-RNA:ta. Keinotekoisissa ribonukleaaseissa katalyyttiseen osaan on liitetty tunnistussekvenssi kohteen tunnistamista varten. Katalyyttisen osan toiminta perustuu usein koordinoituneiden metalli-ionien happo/emäsvuorovaikutukseen, mutta se voi myös olla puhtaasti organokatalyyttinen. Terapeuttisten oligonukleotidien yhteisenä haasteena on kuitenkin heikko soluun kulkeutuminen. Tämän vuoksi niistä valmistetaan usein nanopartikkeleita tai konjugaatteja soluspesifisten ligandien kanssa soluun oton tehostamiseksi.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli syntetisoida RNA:n fosfodiesterisidoksien katkaisemista katalysoiva polyoktavalentti arginiinilyysiini-silseskvioksaanikuutio (COSS-lyysiini-arginiini) ja tutkia sen tehokkuutta organokatalyyttinä sekä mahdollisena koordinaatiokompleksina Zn^{2+} -, Cu^{2+} - ja Pd^{2+} -ionien kanssa. Seuraavaksi tavoitteena oli syntetisoida katalyyttistä kaksi erilaista HER2-geeniä spesifisesti pilkkovaa pallonukleiinihappoa, eli organonanotsyymiä. Nanotsyymit ovat yleinen nimitys nanopartikulaarisille keinotekoisille entsyymeille. Organo puolestaan viittaa keinotekoisien entsyymien organokatalyyttiseen toimintaan. Lisäksi tavoitteena oli selvittää, miten tunnistussekvenssien lisääminen katalyyttiin vaikuttaa kohde-RNA:n pilkkomisen tehokkuuteen.

Katalyytti sekä siitä muodostetut pallonukleiinihapot syntetisoitiin onnistuneesti. Katalyytin todettiin toimivan tehokkaammin pelkkänä organokatalyyttinä, minkä vuoksi sen kykyä katalysoida HER2-geenin pilkkoutumista tutkittiin tarkemmin katalyytillä ilman metallia. Organokatalyytti osoittautui hyvinkin tehokkaaksi HER2-geenin pilkkomisessa. Pallonukleiinihappojen synteisiin käytettiin rengasjännitteistä alkyyni-atsidi sykloadditiota (SPAAC) bisyklononyyni(BCN)-modifioitujen 2'-O-metyyli-RNA-juosteiden ja atsideilla modifioitujen silseskvioksaanin välillä. Pallonukleiinihappojen kykyä katalysoida HER2-geenin pilkkoutumista tarkasteltiin myös pelkkinä organokatalyyttinä.

Pallonukleiinihappojen katalysoimat HER2-geenin hydrolyysireaktiot olivat huomattavasti hitaampia, kuin pelkällä organokatalyytillä. Komplementaaristen oligonukleotidijuosteiden lisäämisen organokatalyyttiin oletettiin nopeuttavan reaktiota, minkä vuoksi selvitettiin, mistä kohdista HER2-geeni pilkkoutuu katalyytin vaikutuksesta. Tulosten perusteella oli havaittavissa yksi selkeä katkaisukohta, joka sijaitsee pallonukleiinihappojen sekä HER2-geenin muodostamien dupleksien komplementaarisella alueella, minkä vuoksi tunnistussekvenssien lisääminen hidasti hydrolyysireaktiota.

Tulosten perusteella syntetisoitu COSS-lyysiini-arginiini -yhdiste on tehokas organokatalyytti, minkä vuoksi sillä on potentiaalia moniin sovellutuksiin. Pallonukleiinihapot eivät osoittaneet niin suurta potentiaalia kohde-RNA:n pilkkomisessa, mutta tunnistussekvenssien optimoinnilla tuloksista voitaisiin saada parempia.

Avainsanat: keinotekoiset ribonukleaasit, pallonukleiinihapot, polyoktavalentit silseskvioksaanikuutiot

Sisällysluettelo

Lyhenneluettelo	5
1 Johdanto	6
1.1 Keinotekoiset ribonukleaasit	7
1.1.1 Katalyyttinen osa	8
1.1.2 Tunnistusalue	10
1.2 Nanopartikkelit lääkeaineiden kuljettajina	12
1.3 Pallonukleiinihapot	12
1.3.1 Keskusrakenteet	14
1.3.2 Synteesi	16
1.4 Työn tarkoitus	17
2 Tulokset ja niiden tarkastelu	19
2.1 Lysiinin ioninvaihto	19
2.2 COSS-lysiini -synteesi	19
2.3 COSS-lysiini-arginiini -synteesi	20
2.4 COSS-lysiini-arginiini -kinetiikkakokeet	23
2.5 HER2-geenin (ON5) komplementaariset oligonukleotidit	27
2.5.1 Oligonukleotidi ON7	27
2.5.2 Oligonukleotidien ON8 ja ON9 synteetit	27
2.6 Pallonukleiinihappojen synteetit	29
2.7 Sulamislämpötilamittaukset	32
2.8 Pallonukleiinihappojen kinetiikkakokeet	33
2.9 HER2-geenin katkaisukohtien selvittäminen	33
3 Materiaalit ja menetelmät	35
3.1 Yleiset menetelmät	35
3.2 Polyoktavalentin arginiinilysiini-silsekvioksaanikuution muodostaminen	36
3.2.1 Yhdisteen 2 synteesi	36
3.2.2 Yhdisteen 5 synteesi	37
3.2.3 Yhdisteen 6 synteesi	38
3.2.4 Yhdisteen 8 synteesi	38
3.2.5 Yhdisteen 10 synteesi	39
3.2.6 Yhdisteen 11 synteesi	40

3.2.7	Yhdisteen 12 synteesi	40
3.3	Oligonukleotidit	41
3.3.1	Oligonukleotidi ON7	41
3.3.2	Oligonukleotidin ON8 synteesi	41
3.3.3	Oligonukleotidin ON9 synteesi	42
3.4	Pallonukleiinihapot	43
3.4.1	Yhdisteen 13 synteesi	43
3.4.2	Yhdisteen 14 synteesi	43
3.5	Kinetiikkakokeet	44
3.5.1	Heksameerien kinetiikkakokeet	44
3.5.2	HER2-sekvenssin kinetiikkakokeet	44
4	Johtopäätökset ja yhteenveto	46
	Lähteet	48
	Liitteet	52

Lyhenneluettelo

AuNP	Kultananopartikkeli
BCN	Bisyklononyyni
BCN-NHS	Bisyklononyyni-N-hydroksisukkini-imidi (engl. bicyclononyne-N-hydroxysuccinimide)
Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonyyli
BOP	bentsotriatsoli-1-yloksitris(dimetyyliamino)fosfoni-heksafluorofosfaatti
CHA	Sykloheksyyliamiini
COSS	Polyoktavalentti silseskvioksaanikuutio (engl. cubic octameric silsesquioxane)
CuAAC	Kuparikatalysoitu alkyyni-atsidi sykloadditio
DCM	Dikloorimetaani
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
HER2	Ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2 (engl. human epidermal growth factor receptor 2)
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
MeCN	Asetonitriili
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
ODN	Oligodeoksiribonukleotidi
ON	Oligonukleotidi
ORN	Oligoribonukleotidi
PAGE	Polyakryyliamidigeelielektroforeesi
Pbf	2,2,4,6,7-pentametyylidihydrobentsofuraani-5-sulfonyyli
PEG	Polyetyleeniglykoli
RISC	RNA-indusoitu hiljennyskompleksi (engl. RNA induced silencing complex)
RNA	Ribonukleiinihappo
siRNA	Pieni häiritsevä RNA (engl. small interfering RNA)
SPAAC	Rengasjännitteinen alkyyni-atsidi sykloadditio
TEAA	Trietyyliammoniumasetaatti
TFA	Trifluoretikkahappo
TfOH	Trifluorometaanisulfonihappo
TLC	Ohutkerroskromatografia
TMS	Tetrametyylisilaani

1 Johdanto

Perinteisissä terapeuttisissa menetelmissä sairauksiin, jotka johtuvat epänormaalista geenien säätelystä, vaikutetaan patogeenisten proteiinien tasolla. Menetelmien haasteena on niiden huono selektiivisyys, off-target -vaikutukset ja niiden aiheuttama toksisuus. Perinteisille menetelmille potentiaalinen vaihtoehto on katalyyttinen, sekvenssispesifinen vaikuttamien ribonukleiinihappojen (RNA) tasolla tehokkaamman ja selektiivisemmän hoidon takaamiseksi.¹

RNA:han kohdistuvia sekvenssispesifisiä terapeuttisia oligonukleotideja, esimerkiksi antisense-oligonukleotideja ja pieniä häiritseviä RNA:ita (siRNA), tutkitaan laajalti ja ne ovat yhä lupaavampia käytettäväksi hoitokeinona moniin sairauksiin.² Antisense-oligonukleotidien ja siRNA:iden toimintamekanismi RNA:n hajottamiseksi ja proteiinien ilmentymisen hiljentämiseksi edellyttää solunsisäisten entsyymikompleksien, ribonukleaasi H:n ja RNA-indusoidun hiljennyskompleksin (RISC-kompleksin, engl. RNA induced silencing complex) toimintaa. Kummatkin entsyymikomplekseista osallistuvat solun normaaliin RNA:n säätelyyn, minkä vuoksi niiden värvääminen johtaa haitallisiin sivuvaikutuksiin, kuten onkogeneenien ylisääteelyyn.³ Tästä syystä keinotekoiset ribonukleaasit, jotka pystyvät hajottamaan RNA:ta ilman solunsisäisten entsyymikompleksien toimintaa, olisivat potentiaalinen vaihtoehto RNA:ta kohdistavaksi terapeuttiseksi menetelmäksi.⁴

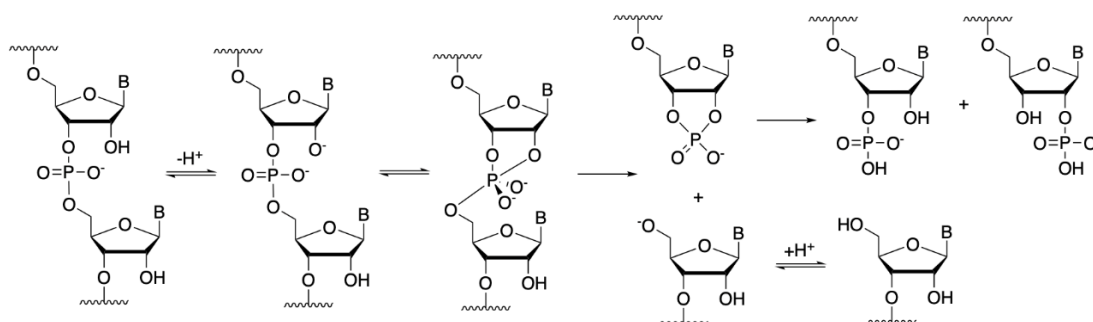
Terapeuttisten oligonukleotidien käytön haasteena on niiden heikko stabiilius solun nukleaaseja kohtaan sekä epäsuotuisat fysikokemialliset ominaisuudet, jotka estävät niiden tehokkaan kulkeutumisen soluihin.⁵ Nanopartikkelien hyödyntäminen terapeuttisten oligonukleotidien kuljetuksessa parantaa oligonukleotidien soluun kulkeutumista sekä *in vivo* soveltuvuutta.⁶ Esimerkkinä tästä ovat nanopartikkelin ja oligonukleotidin muodostamat dendriittiset oligonukleotidikonjugaatit, joita kutsutaan pallonukleiinihappoiksi.⁷

Tässä tutkimuksessa pyritään muodostamaan kaksi erilaista pallonukleiinihappoa, joissa yhdistyy keinotekoisien ribonukleaasin katalyyttinen aktiivisuus sekä nanopartikkelin tuomat soluun ottoa tehostavat kuljetinominaisuudet. Muodostettujen pallonukleiinihappojen olisi tarkoitus pilkkoa selektiivisesti HER2-geeniä (HER2, engl. human epidermal growth factor receptor), joka on onkogeneeni, jota esiintyy monistuneena muun muassa rintasyövän solulinjoissa.⁸ Tällöin saataisiin potentiaalinen terapeuttinen menetelmä HER2-geenin säätelämiseksi.

1.1 Keinotekoiset ribonukleasit

Soluissa luonnollisesti tapahtuvaa sekvenssispesifistä RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolysoitumista katalysoivat ribonukleasit sekä katalyyttiset RNA-molekyylit, ribotsyymit.⁴ Ribotsyymien synteettisten jäljitelmien kehittäminen on ollut monien tutkimusten kohteena viime vuosikymmeninä. Tällaisia yhdisteitä kutsutaan keinotekoisiksi ribonukleaseiksi.⁹ Keinotekoiset ribonukleasit matkivat luonnollisten ribonukleasien toimintaa ja ne pystyvät nopeuttamaan RNA:n fosfodiesterisidosten spontaania ja irreversiibeliä hajoamista.¹ Ne koostuvat kahdesta osasta, katalyyttistä ja ohjaavasta oligonukleotidista. Katalyyttinen osa vastaa fosfodiesterisidosten pilkkomisesta. Oligonukleotidijuoste toimii ribonukleasin tunnustusalueena kohde-RNA:lle.⁴

RNA:n entsymaattinen pilkkominen fysiologisissa olosuhteissa tapahtuu pääsääntöisesti nukleofiilisen pilkkoutumisen kautta.⁹ Nukleofiilisessa reaktiossa (Kaavio 1) 2'-hydroksyyli-ryhmä deprotonoituu, jonka jälkeen syntynyt nukleofiili hyökkää fosfodiesterisidoksen fosforiatomiin, jolloin 5'-päähän kiinnittynyt nukleosidi irtoaa oksianionina. Reaktiossa muodostuu myös 2',3'-syklinen fosfaatti, joka hydrolysoituu nopeasti 2'- ja 3'-fosfaateiksi. Kyseistä reaktiota voidaan nopeuttaa edistämällä protonin siirtoa 2'-OH-ryhmältä 5'-O⁻-ryhmälle. Sopivia katalyyttejä ovat molekyylit ja ionit, jotka edistävät 2'-OH-ryhmän deprotonaatiota, stabiloivat fosforaani-intermediaattia, ohjaavat tulevaa ja lähtevää nukleotidia optimaalisiin suuntiin tai edistävät 5'-O⁻-ryhmän protonaatiota. Keinotekoisina ribonukleaseina toimivien yhdisteiden edellytyksenä on, että ne pystyisivät nopeuttamaan RNA:n hydrolyysiä yhdellä tai useammalla edellä mainitulla tavalla.⁹

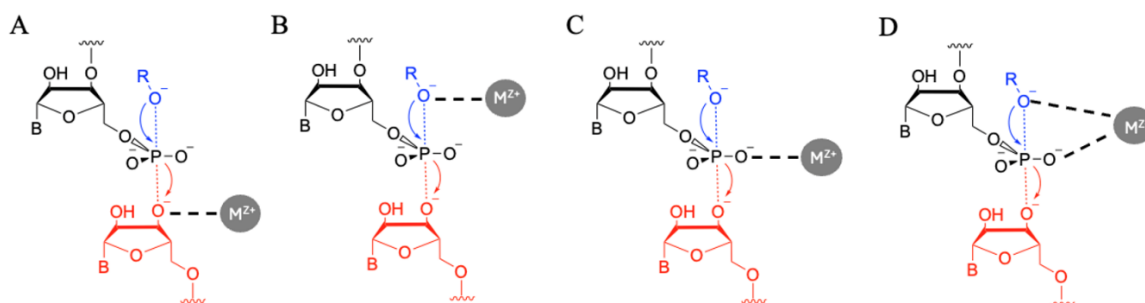


Kaavio 1. RNA:n fosfodiesterisidoksen hydrolysoituminen.

1.1.1 Katalyyttinen osa

Keinotekoisien ribonukleaasien katalyyttinen osa voi toimia koordinoitujen metalli-ionien välityksellä tai se voi olla organokatalyyttinen. Metallionien tiedetään edistävän nukleiinihappojen pilkkoutumista vesiliuoksessa.¹⁰ Metallien kanssa toimivat keinotekoiset ribonukleaasit jaetaan yleensä kahteen ryhmään: lantanidi-ioni -kelaatteihin sekä Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -kelaatteihin.⁴ Lisäksi myös muita divalentteja kationeja voidaan käyttää RNA:n hydrolyysin katalysoimisessa.^{4,10} Metallionien tulee koordinoitua keinotekoisien ribonukleaasin rakenteeseen, jotta metallionien edistämä RNA:n hajoaminen olisi mahdollista. Lantanidi-ioni -kelaattien on todettu olevan tehokkaita katalyyttejä.^{10,11} Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -kelaattien etuna lantanideihin verrattuna on kuitenkin se, että Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -ioneja, erityisesti Zn^{2+} , esiintyy pienissä määrin luontaisesti soluissa, minkä vuoksi voidaan olettaa, että ligandit, jotka sitovat kyseisiä ioneja, esiintyvät osittain komplekseina myös solunsisäisessä ympäristössä.¹² Kompleksi voi myös olla niin vahva, että katalyytin toiminta tulee riippumattomaksi solunsisäisestä metallionipitoisuudesta.

Metallionit voivat katalysoida fosfodiesterisidosten hydrolyysiä useilla tavoilla (Kuva 1). Ne voivat osallistua lähtevän ryhmän aktivointiin koordinoitumalla lähtevän ryhmän happiatomiin (a). Metallionit voivat myös koordinoitua nukleofiilin kanssa, jolloin ne aktivoivat sen (b). Lisäksi metallionit voivat lisätä fosfaatin elektrofiilisyyttä ja alttiutta nukleofiiliselle hyökkäykselle koordinoitumalla sen vapaaseen happiatomiin (c). Yhdistämällä mekanismit (a) ja (c) saadaan mekanismi (d), jossa fosforyyliryhmän vapaa happiatomi sekä nukleofiili ovat koordinoituneita metallioniin, mikä stabiloi reaktiossa vaadittavaa geometriaa. Lisäksi kummankin negatiivisesti varautuneen ryhmän koordinoiminen vähentää varausten aiheuttamaa elektrostaattista hylkimistä.^{10,13,14}



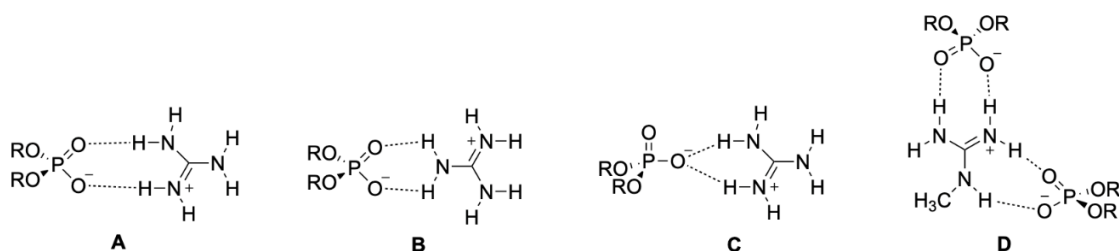
Kuva 1. Metallionien katalysoima RNA:n fosfodiesterisidoksen nukleofiilinen hydrolysoituminen.

Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että metallin kanssa toimivat katalyytit ovat olleet tehokkaampia kuin ilman metallia toimivat. Niiden ongelmana on kuitenkin se, että metallit voivat irrota niitä koordinoivista ligandeista ja voivat aiheuttaa muiden, kuin kohteena olevien, biopolymeerien hajoamisen. Tämä voi johtaa ei-toivottuihin sivuvaikutuksiin ja sytotoksisuuteen.¹⁵ Ilman metallia toimivat katalyytit voisivat olla vähemmän myrkyllisiä ja helpommin kontrolloitavissa olevia, minkä vuoksi kyseiset rakenteet ovat herättäneet kiinnostusta terapeuttisissa sovellutuksissa.^{3,4}

Ilman metallia toimivat katalyytit ovat usein tyyppiä sisältäviä yhdisteitä. Katalyyttinen osa matkii luonnollisten entsyymien toimintaa, joiden katalyyttiset keskukset sisältävät imidatsoli-, guanidiini/guanidinium- ja/tai amiiniryhmiä sisältäviä aminohappoja. Tällaisia aminohappoja ovat histidiini, arginiini ja lysini.⁴ Guanidinium-ionin sisältävät rakenteet ovat osoittautuneet kaikkein tehokkaimmiksi.^{16,17} Fysiologisissa olosuhteissa arginiinin sivuketjussa oleva voimakkaasti emäksinen guanidiiniryhmä on positiivisesti varautunut guanidinium-ioni.^{18,19} Guanidinium-ioni sisältää kolme amiinia järjestäytyneenä samaan tasoon ja se säilyy protonoituneena laajalla pH-alueella. Arginiinin sivuketjussa esiintyessään guanidinium-ioni voi muodostaa jopa viisi vetysidosta. Nämä rakenteelliset ominaisuudet ovat syy siihen, miksi guanidinium-ioni voi toimia RNA:n tunnistamisessa sekä katalyyttinä RNA:n hydrolyysissä.¹⁹

Guanidinium-ioni voi katalysoida RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolyysiä kolmella tavalla. Se voi toimia heikkona emäksenä deprotonoiden 2'-OH -ryhmän, elektrofiilina/heikkona happona stabiloiden fosforaani-intermediaattia tai happona, joka protonoi lähtevän ryhmän (5'-OH).¹⁸ Guanidinium-ioni toteuttaa siis luvussa 1.1 esitetyn edellytyksen, joita keinokeoisina ribonukleasina toimivilta yhdisteiltä vaaditaan RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolyysin katalyyysin kannalta.

Guanidinium-ioni muodostaa yleisimmin vetysidoksia kolmella eri tavalla fosfaattien kanssa RNA:n tunnistamiseksi. Kaikkein yleisimmässä rakenteessa guanidinium-ionin ja fosfaatin välille muodostuu kaksi vetysidosta, siten että ne muodostuvat kahden eri amiinin ja kahden eri hapen välille (Kuva 2A). Toisessa vaihtoehdossa vetysidokset lähtevät guanidinium-ionin yhdestä amiinista fosfaatin kahteen eri happeen (Kuva 2B). Kolmannessa vaihtoehdossa eri amiiniryhmät muodostavat kaksi vetysidosta yhden hapen kanssa (Kuva 2C).¹⁹ Yksi tapa, miten guanidinium-ioni voi myös tunnistaa RNA:n, on ”arginiinihaarukan” muodostaminen, missä yksi guanidinium-ioni yhdistää kaksi fosfaattia muodostamalla yhteensä neljä vetysidosta (Kuva 2D).¹⁹



Kuva 2. Guanidinium-ionin muodostamat vetysidokset fosfaattien kanssa RNA:n tunnistamiseksi.

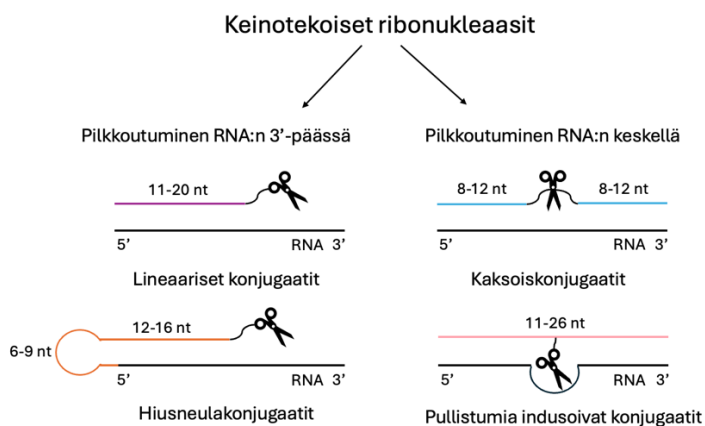
1.1.2 Tunnistusalue

Tunnistusalueena toimiva oligonukleotidijuoste voidaan suunnitella ohjaamaan RNA:n pilkkoutuminen mihin tahansa RNA-kohteeseen, jonka sekvenssi tunnetaan. Tämä on mahdollista, sillä komplementaariset juosteet sitoutuvat selektiivisesti Watson-Crick -emäspariperiaatteen mukaan. Keinotekoisien ribonukleaasien toivotaan pilkkovan kohde-RNA:ta yhdessä, ennalta määritetyssä, kohdassa. Yhtenä vaatimuksena keinotekoisille ribonukleaaseille on myös se, että niiden tulisi vapauttaa nopeasti pilkotut RNA-fragmentit, jotta vältetään tuotteen aiheuttamalta inhibitiolta.¹² Keinotekoisien ribonukleaasien tulisi siis inaktivoida useampi kohde-RNA-molekyyli pitkällä aikavälillä. Tämä voidaan saavuttaa vain siten, että pilkkoutuneet kohde-RNA:n fragmentit irtoavat ribonukleaasin ja kohde-RNA:n muodostamasta hybridisoituneesta rakenteesta, jolloin ribonukleaasi voi sitoutua seuraavaan kohde-RNA-molekyyliin.³ Tätä hankaloittaa kuitenkin se, että kohde-RNA:n ja komplementaarisen juosteen sitoutumisen tulee lisäksi olla tarpeeksi vahva, jotta pilkkoutumisreaktio voi tapahtua halutussa kohdassa, jotta vältetään ei-toivottujen kohteiden pilkkoutumiselta ja siitä aiheutuvalta toksisuudelta.¹⁵

Keinotekoisien ribonukleaasien toimivuuteen ja tehokkuuteen vaikuttaa myös se, mihin kohtaan oligonukleotidia katalyyttinen osa kiinnitetään. Yksijuosteiset alueet kohde-RNA:ssa pilkkoutuvat huomattavasti tehokkaammin kuin kaksijuosteiset.^{20,21} Tämän vuoksi katalyyttinen osa tulisi kiinnittää oligonukleotidin päähän. Jos katalyyttinen osa kuitenkin sijaitsee keskellä oligonukleotidia, tulisi komplementaarisen juosteen sekä kohde-RNA:n sitouduttava siten, että kohde-RNA:han muodostuu herkästi pilkkoutuva yksijuosteinen alue tai pullistuma.^{21,22} Lyhyt synteettinen oligonukleotidi, oligodeoksiribonukleotidi (ODN) tai oligoribonukleotidi (ORN), liitetään kovalenttisesti linkkerillä katalyyttiseen osaan. ODN ja 2'-*O*-alkyyli-ORN ovat yleisimmin käytettyjä tunnistussekvenssejä. 2'-*O*-alkyyli -modifiointi,

kuten 2'-OMe, suojaa oligonukleotidia itsepilkkoutumiselta, luonnollisten nukleaasien hajotukselta sekä lisää sitoutumisen affiniteettia kohde RNA:n kanssa.^{4,12}

Oligonukleotidin rakenteen perusteella keinotekoiset ribonukleaasit voidaan jakaa neljään ryhmään: lineaarisiin konjugaatteihin, kaksoiskonjugaatteihin, pullistumia indusoiviin konjugaatteihin (engl. bulge-inducing conjugates) sekä hiusneulakonjugaatteihin (engl. hairpin conjugates) (Kuva 3). Lineaarisisissa konjugaateissa oligonukleotidi on lineaarinen sekä lyhyt, 11–20 nukleotidin mittainen, ja se on kauttaaltaan komplementaarinen kohde-RNA:n kanssa.⁴ Lineaarisisissa konjugaateissa katalyytti on liitettyä oligonukleotidin 5'-päähen. Tällöin kohde-RNA:n 3'-päässä vapaaksi jäänyt yksijuosteinen alue pysyy katalyyttisen osan pilkkottavissa.⁴ Kaksoiskonjugaateissa oligonukleotidi on jaettu kahdeksi lyhyemmäksi juosteeksi, joista toinen on komplementaarinen kohde-RNA:n 5'-pään kanssa ja toinen 3'-pään kanssa. Juosteet ovat 8–12 nukleotidin mittaisia RNA-substraatin mukaan. Katalyytti sijaitsee näiden juosteiden välissä ja on suunnattu kohti lyhyttä, 3–5 nukleotidin mittaista, yksijuosteista kohde-RNA:n aluetta, joka muodostuu oligonukleotidien sitoutuessa kohde-RNA:han.¹ Hiusneulakonjugaateissa oligonukleotidi on laskostunut hiusneulasilmukaksi, joka koostuu 6–9 nukleotidin mittaisesta rungosta sekä 12–16 nukleotidin mittaisesta yksijuosteisesta fragmentista, joka on komplementaarinen kohde-RNA:n 5'-pään kanssa. Hiusneulasilmukka parantaa muodostuvan dupleksin stabiilisuutta solun nukleaaseja kohtaan.²³ Pullistumia indusoivissa konjugaateissa oligonukleotidin sekvenssi on suunniteltava siten, että kohde-RNA:n keskelle jää 2–5 nukleotidin mittainen alue, joka ei ole komplementaarinen kohde-RNA:n kanssa. Tällöin juosteiden sitoutuessa toisiinsa, kohde-RNA:han muodostuu yksijuosteinen pullistuma, joka tekee siitä alttiin pilkkoutumiselle.³ Katalyytti sijaitsee muodostuvaa pullistumaa vastapäätä.⁴



Kuva 3. Oligonukleotidin rakenteen perusteella jaotellut konjugaatit.

1.2 Nanopartikkelit lääkeaineiden kuljettajina

Nanoteknologian lääketieteellisten sovellutusten käyttö ja kehitys on kasvanut huimasti viimeisten vuosikymmenien aikana. Nanopartikkeleja ja -materiaaleja voidaan käyttää lääkeaineiden kuljettamisessa spesifisesti kohdesoluihin ja -kudoksiin.⁶ Nanopartikkelit ovat pieniä hiukkasia, joiden koko vaihtelee 1–100 nm välillä. Ne voidaan suunnitella siten, että niiden pinnan ominaisuuksien avulla niiden on mahdollista tunnistaa sairaiden kudosten solut ilman, että lääkeaine vaikuttaa terveisiin soluihin. Tämä tekee lääkkeistä tehokkaampia ja vähentää mahdollisia sivuvaikutuksia.²⁴ Nanopartikkelit voidaan myös suunnitella siten, että ne vapauttavat lääkeaineen kontrolloidusti, mikä mahdollistaa lääkeaineen jatkuvan annostelun.^{6,25}

Nanopartikkeleihin kohdistuvat tutkimukset keskittyvät nanopartikkelien koon, muodon, pinta-alan ja pinnan kemiallisten ominaisuuksien muokkaamiseen, jotta pystytään maksimoimaan niiden hyödyt lääketieteellisiin sovellutuksiin. Erilaisia nanopartikkeleja, kuten kultananopartikkeleja (AuNP), liposomeja ja misellejä, voidaan syntetisoida useilla eri tavoilla, jolloin niiden kokoa ja muotoa voidaan muokata sen mukaan, mihin tarkoitukseen nanopartikkelia tarvitaan. Nanopartikkelien pinnan kemiallisia ominaisuuksia voidaan muokata lisäämällä pinnalle reaktiivisia ryhmiä tai molekyyliä, kuten vasta-aineita tai pallonukleiinihappojen tapauksessa sekvenssispesifisiä oligonukleotideja.^{6,26}

1.3 Pallonukleiinihapot

Pallonukleiinihapot ovat dendriittisiä oligonukleotidikonjugaatteja, jotka toimivat kuljettimina terapeuttisille oligonukleotideille. Pallonukleiinihappoissa lyhyet oligonukleotidit ovat pakkautuneet tiiviisti keskusrakenteena toimivan nanopartikkelin ympärille, muodostaen kolmiulotteisen pallomaisen rakenteen.²⁷ Pallonukleiinihapot voidaan valmistaa joko yksi- tai kaksijuosteisista oligonukleotideista. Oligonukleotidit ovat yleisimmin DNA:ta tai RNA:ta, jotka on suunniteltu vuorovaikuttamaan kohdemolekyylien, kuten proteiinireseptorien tai komplementaaristen juosteiden kanssa.⁷ Oligonukleotidien kolmiulotteisen suuntautumisen vuoksi pallonukleiinihappojen oligonukleotidikuorten vuorovaikutus biologisen ympäristön, esimerkiksi solun pinnan reseptorien, kanssa on hyvin erilainen kuin niiden lineaarisilla vastineilla.^{7,27} Ne tunkeutuvat tehokkaasti soluun, ovat stabiilimpia solun nukleaaseja kohtaan, ne eivät akkumuloidu munuaisiin ja ne kykenevät välttämään munuaissuodatuksen.^{7,28}

Nukleasiresistenttiys johtuu pallonukleiinihapon tiheästä elektronikuoresta.²⁹ Pallonukleiinihapon nukleasiresistenttiyteen vaikuttaa sekvenssi, linkkeri, oligonukleotidikuoren tiheys sekä pinnan rakenne.²⁷ Lineaaristen RNA:iden osalta tiedetään, että ribonukleasi A -tyypin entsyymit osallistuvat RNA:n hydrolyysiin erityisesti 5'-3'/3'-5' UA/AU sekvenssialueilla.^{30,31} Pallonukleiinihappojen kohdalla, kun kyseiset sekvenssialueet sijaitsevat lähellä nanopartikkelin pintaa, ne hydrolysoituvat nopeasti nukleasien katalysoimana. Eli tiheästä oligonukleotidikuoresta riippumatta, ribonukleasien tunnistamat sekvenssialueet hajoavat nopeasti samaan tapaan kuin lineaarisilla vastineilla. Pallonukleiinihappojen suunnittelussa tulisi siis välttää UA/AU sekvenssialueita. Linkkerin jäykkyydellä voidaan vaikuttaa myös nukleasistabiiliuteen. Jäykät linkkerit, kuten polyT DNA, työntävät tunnistusekvenssin kauemmaksi nanopartikkelista verrattuna joustavampiin linkkereihin. DNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen kanssa on todettu, että oligonukleotidien yksi- tai kaksijuosteisuus ei vaikuta DNAasi I -entsyymien katalysoiman hydrolyysin nopeuteen.³² RNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen kohdalla puolestaan kaksoisjuosteiden vähentäminen nanohiukkasen pinnalla tekee pallonukleiinihaposta helpommin saavutettavan nukleaseille. Polyetyleeniglykoli (PEG) ketjujen lisäämisen pinnan rakenteeseen on todettu pidentävän pallonukleiinihappojen puoliintumisaikaa huomattavasti. Pinnan rakenteella on siis tärkeä rooli nukleasistabiiliuden kannalta, sillä PEG-ketjujen kaltaisten rakenteiden lisääminen nanopartikkelin pinnalle heikentää nukleasien pääsyä rakenteeseen.²⁷

Pallonukleiinihappojen merkittävin ominaisuus terapeuttisten oligonukleotidien kuljettamisen kannalta on se, että useista negatiivisista varauksista huolimatta ne läpäisevät solukalvon tehokkaasti Scavenger-reseptorien välittämällä endosytoosilla.³³ Tämä mahdollistaa suurten oligonukleotidimäärien kuljettamisen soluihin, mikä edistää optimaalisen paikalliskonsentraation saavuttamista terapeuttisten oligonukleotidien ja kohde-RNA:n välille.^{26,33} Lineaariset vastineet puolestaan usein vaativat kationisen välittäjämolekyylin, jotta ne kykenevät läpäisemään negatiivisesti varautuneen solukalvon.³⁴ Pallonukleiinihappojen tiheä oligonukleotidikuori jäljittelee Scavenger-reseptorien ligandeina toimivien polynukleotidien rakennetta, minkä vuoksi myös pallonukleiinihapot voivat toimia ligandeina kyseisille reseptoreille ja näin ollen läpäistä solukalvon luonnollisesti ilman välittäjämolekyylejä.³⁵ Oligonukleotidikuoren tiheys vaikuttaa pallonukleiinihapon sekä Scavenger-reseptorien väliseen vuorovaikutukseen, sillä mitä tiheämpi oligonukleotidikuori on, sitä tehokkaampaa endosytoosin on todettu olevan.³⁴ Tämä ei kuitenkaan ratkaise

endosomaaliseen vapautumiseen liittyvää ongelmaa, joka on edelleen yksi suurimmista haasteista oligonukleotidien soluun otossa.³⁶

1.3.1 Keskusrakenteet

Pallonukleiinihappojen keskusrakenteina on käytetty useita eri rakenteita ja rakenteen valinnalla voidaan vaikuttaa pallonukleiinihappojen ominaisuuksiin. Keskusrakenteen koko ja sen tuoma polyvalenttisuus ovat merkittävässä roolissa pallonukleiinihappojen toiminnan kannalta.³⁷ Keskusrakenteen koko määrittää oligonukleotidikuoren tiheyden, mikä vaikuttaa muun muassa immuunivasteeseen.^{38,39} Pallonukleiinihappojen ainutlaatuiset ominaisuudet, kuten nukleasiresistenttiys ja tehokas soluun kulkeutuminen, johtuvatkin pääasiassa oligonukleotidikuoren tiheydestä ja suuntautumisesta nanorakenteen pinnalla.^{7,26} Keskusrakenteet jäävät usein soluun, minkä vuoksi pallonukleiinihappojen rakenteiden suunnittelussa tulee myös ottaa huomioon niiden bioyhteensopivuus ja biohajoavuus.^{40,41}

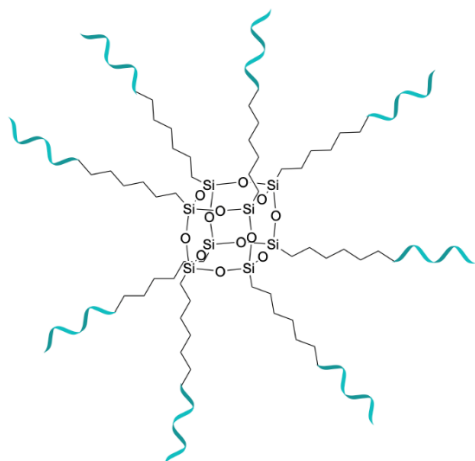
Ensimmäisten pallonukleiinihappojen keskusrakenteena käytettiin kultananopartikkeleita. Tällaisten konjugaattien rakenteiden ominaisuudet ovat laajimmin tutkittuja.^{7,42} Kultananopartikkelit valittiin alkuvaiheessa keskusrakenteiksi, sillä niitä voidaan helposti syntetisoida eri hiukkaskokoina, ne ovat helposti funktionalisoitavissa sekä niillä on selkeästi määritellyt katalyyttiset ominaisuudet.²⁹ Kultananopartikkelien lisäksi myös muiden epäorgaanisten nanopartikkelien, kuten hopean⁴³, kvanttipisteiden (engl. quantum dots)⁴⁴, piioksidin (silikan)⁴⁵ sekä metallioksidien⁴⁶, fysikaaliset ominaisuudet ovat osoittautuneet keskusrakenteen kannalta potentiaalisiksi pallonukleiinihappojen rakenteiden kehityksessä.^{7,41} Epäorgaanisten keskusrakenteiden huonona puolena on kuitenkin niiden pitkäaikainen myrkyllisyys, sillä ne kerääntyvät elimistössä esimerkiksi maksaan ja pernaan.⁴⁷ Piioksidididyrakenteet kuitenkin poikkeavat muista epäorgaanisista ydirakenteista, sillä ne ovat onttoja ja bioyhteensopivia rakenteita.⁴⁵

Orgaaniset keskusrakenteet ovat biohajoavia ja bioyhteensopivia, minkä vuoksi ne olisivat parempi vaihtoehto biolääketieteellisiin sovelluksiin kuin epäorgaaniset rakenteet.⁴⁸ Orgaanisia keskusrakenteita ovat muun muassa liposomit⁴⁹, polymeerit⁵⁰, proteiinit⁵¹ ja muut makromolekyylit^{52,53}. Ihanteellisessa tapauksessa keskusrakenteen olisi hyvä olla valmistettavissa helposti saatavilla olevista lähtöaineista, jota voidaan syntetisoida teollisessa mittakaavassa, ja joka lisäksi koostuu komponenteista, joita on käytetty jo Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkeviraston, FDA:n, hyväksymissä lääkeaineissa.^{49,54} Tästä syystä esimerkiksi liposomi-keskusrakenteen sisältävät pallonukleiinihapot saivat alkunsa. Liposomi-

keskusrakenne koostuu lipidimonomeereistä, jotka muodostavat yksikalvoisen rakkulan, joka on halkaisijaltaan 30 nm.⁴⁹ Tällöin liposomin koko on optimaalinen verenkierron pysymisen kannalta sekä se estää myös rakenteen poistumisen munuaisten kautta.⁵⁴ Liposomin pinta on funktionalisoitu nukleiinihappojohdannaisilla, jotka sisältävät tokoferoliryhmän. Hydrofobinen tokoferoliryhmä asettuu tehokkaasti liposomin lipidikaksoiskalvoon.⁴⁹

Edellä mainittujen pallonukleiinihappojen rakenteelliset erot keskusrakenteen koossa sekä oligonukleotidien lukumäärässä tekevät pallonukleiinihappojen rakenteen ja toiminnan välisestä tutkimuksesta haastavaa. Tästä syystä on kehitetty molekulaariset pallonukleiinihapot, joissa ydinrakenteisiin konjugoitujen oligonukleotidien määrä olisi aina sama. Li ym. kehittivät kaksi erilaista molekulaarista pallonukleiinihappoa, joissa keskusrakenteina oli 12:lla atsidilinkkerillä modifioitu C₆₀-fullereeni tai 8:lla atsidilinkkerillä modifioitu polyoktavalentti silseskvioksaanikuutio (T₈-COSS, COSS, engl. cubic octameric silsesquioxane). Keskusrakenteiden atsidiryhmiin kiinnitettiin vesiliuoksessa dibentsosyklo-oktyynilla muokatut antisense-DNA-juosteet. 12-haaraisen C₆₀-fullereeni -pallonukleiinihapon oligonukleotidikuori on tiheämpi kuin 8-haaraisella T₈-COSS -pallonukleiinihapolla, minkä vuoksi sillä on parempi stabiilius nukleaaseja kohtaan sekä se kulkeutuu paremmin soluun.²⁶ Tässä tutkielmassa keskitytään kuitenkin helposti saatavilla olevan T₈-COSS -keskusrakenteen ominaisuuksiin sekä mahdollisuuksiin pallonukleiinihappojen keskusrakenteena.

Polyoktavalenttisten silseskvioksaanikuutioiden yleinen rakennekaava on (RSiO_{3/2})₈, jossa R = H tai jokin muu orgaaninen ryhmä. Rakenteessa piiatomiin on sitoutunut kovalenttisesti kolme happiatomia. Rakenne on halkaisijaltaan 0,53 nm.⁵⁵ Polyoktavalentti silseskvioksaanikuutio (Kuva 4) on hyvinkin potentiaalinen vaihtoehto pallonukleiinihappojen keskusrakenteeksi sen kolmiulotteisen rakenteen, nanoskaalan koon, alhaisen toksisuuden sekä hyvän liukoisuuden ansiosta.⁵⁶ Lisäksi niiden syntetisoinnin yksinkertaisuus ja edullisuus, sekä rakenteen helppo ja monipuolinen muokattavuus lisäävät niiden potentiaalia erilaisissa sovellutuksissa.^{57,58} Piioksidipohjaisia materiaaleja käytetään laajalti biolääketieteen sovelluksissa niiden inerttiyden ja bioyhensopivuuden takia.⁵⁹



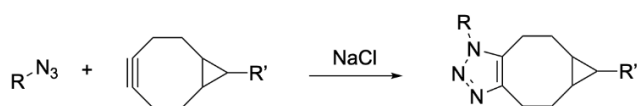
Kuva 4. Yksinkertaistettu malli pallonukleiinihaposta, jonka keskusrakenteena on polyoktavalenttien silseskvioksaanikuutio (T_8 -COSS).

1.3.2 Synteesi

Vaadittavat reaktio-olosuhteet oligonukleotidien konjugoimiseksi keskusrakenteeseen vaihtelevat sen mukaan, mikä keskusrakenne on kyseessä.⁷ Kuparikatalysoitu alkyyni-atsidi-sykloadditio -reaktio (CuAAC) on yksinkertainen ja monikäyttöinen menetelmä biokonjugaatioihin, minkä vuoksi se on potentiaalinen menetelmä nanoteknologian sovelluksissa.^{46,60} Menetelmä on erinomainen valinta, kun halutaan konjugoida oligonukleotideja nanopartikkeleihin, sillä sen bio-ortogonaalisuus ja reaktiotehokkuus mahdollistavat konjugaation myös suolapitoisessa ympäristössä, joka tarvitaan vierekkäisten oligonukleotidien sähköisen hylkimisen estämiseksi.⁴⁶

Turun yliopiston bio-orgaanisessa tutkimusryhmässä on kehitetty kaksivaiheinen menetelmä molekulaaristen pallonukleiinihappojen syntetisoimiseksi, joka toimii useiden keskusrakenteiden kanssa. Kyseessä on rengasjännitteen tehostama alkyyni-atsidi sykloadditio (SPAAC) (Kaavio 2). Menetelmän avulla keskusrakenteeseen voidaan liittää kontrolloidusti yksi oligonukleotidi, joka on funktionalisoitu leimalla tai jollain mulla konjugaattiryhmällä. Tällöin muut haarat voidaan täyttää oligonukleotideilla, joita ei ole funktionalisoitu tai on konjugoitu eri ryhmällä kuin monofunktionalisaatiossa. Monofunktionalisaatiossa bisyklononyynillä (BCN) -modifioitu oligonukleotidi altistetaan pienelle ylimäärälle keskusrakennetta, joka on liuotettuna dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Täysfunktionalisaatiossa monofunktionalisoidun konjugaatin jäljellä oleviin vapaisiin haaroihin liitetään BCN-modifioitua oligonukleotideja 1,5 M natriumkloridin vesiliuoksessa. Täysfunktionalisaatiossa

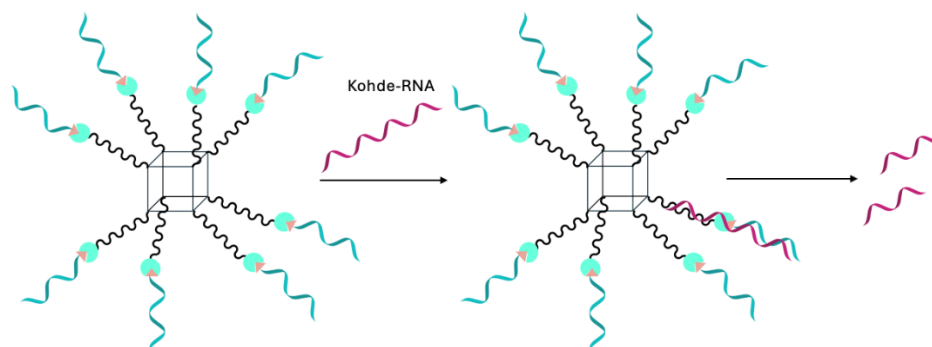
BCN-modifioituja oligonukleotideja on pieni ylimäärä monofunktionalisoitua konjugaattiin nähden.⁶¹



Kaavio 2. SPAAC-reaktio

1.4 Työn tarkoitus

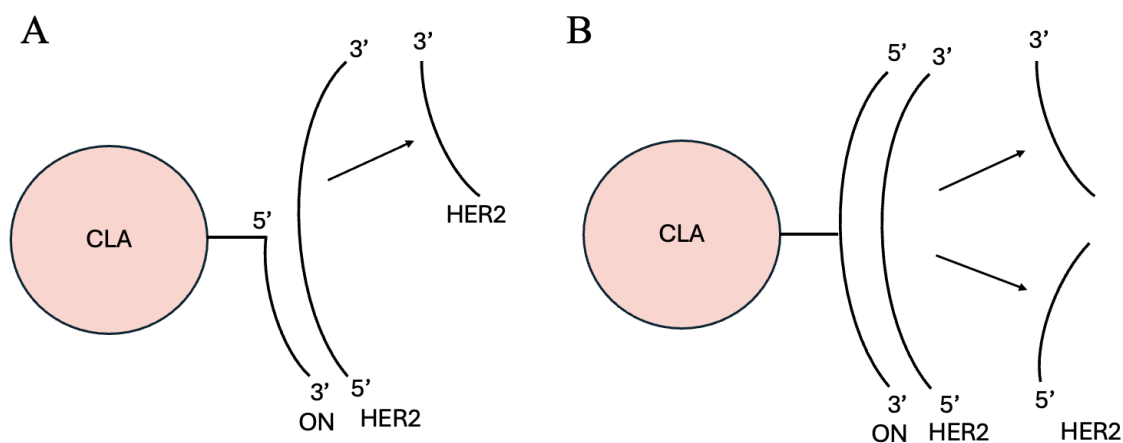
Tämän työn tarkoituksena oli valmistaa kaksi pallonukleiinihappoa, jotka toimivat keinotekoisina ribonukleaaseina, pilkkoen selektiivisesti HER2-geeniä ja joilla on nanopartikkelin tuomat soluun ottoa tehostavat kuljetinominaisuudet (Kaavio 3). Työ aloitettiin syntetisoimalla ensin konjugaateissa käytettävä keskusrakenne, oktaalentti arginiinilyysiinilseskvioksaanikuutio (T_8 -COSS-lysiini-arginiini). T_8 -COSS-rakenteeseen liitettiin ensin atsido-modifioitu lysyiini oligonukleotidijuosteiden kiinnittämistä varten. Tämän jälkeen keskusrakenteeseen liitettiin arginiini katalyyttisen aktiivisuuden saavuttamiseksi. Muodostetun keskusrakenteen kykyä toimia katalyyttinä RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolyysissä tutkittiin ilman metallia sekä mahdollisena koordinaatiokompleksina Zn^{2+} , Cu^{2+} ja Pd^{2+} -ionien kanssa.



Kaavio 3. Pallonukleiinihapon katalysoima kohde-RNA:n hajoaminen.

Keskusrakenteen synteessin ja kinetiikkatutkimusten jälkeen, katalyyttistä muodostettiin kaksi erilaista pallonukleiinihappoa, joissa oli tunnistussekvenssit HER2-geenille. Liitetyt RNA-juosteet olivat 2'-OMe -modifioituja, jotta ne eivät hajoa nukleasien vaikutuksesta. Ensimmäisessä pallonukleiinihapossa (Kuva 5A) HER2-geenille komplementaarinen juoste oli

8 nukleotidin mittainen. Oligonukleotidin 5'-pään liitettiin BCN-ryhmä, jonka avulla se pystyttiin liittämään SPAAC-reaktion avulla kesusrakenteeseen. Oligonukleotidi oli komplementaarinen HER2-geenin 5'-pään kanssa, jolloin kohteen 3'-pää jäi vapaaksi katalyytin pilkkomista varten. Toisen pallonukleiidihapon (Kuva 5B) oligonukleotidijuosteessa oli 7 nukleotidin mittaiset komplementaariset alueet HER2-geenin 5'- sekä 3'- päälle ja keskellä juostetta sijaitseva vapaa aminoryhmä, johon liitetyn BCN-muokkauksen avulla katalyytti kiinnitettiin komplementaaristen juosteiden väliin. Juosteiden hybridisoituessa komplementaaristen alueiden väliin jäi yhden nukleotidin mittainen yksijuosteinen alue HER2-geenissä. Lähes täysin komplementaarisen juosteen ja keskeltä kiinnitetyn katalyytin ajateltiin pilkkovan kohde-RNA:ta muodostuneen jännitteen ansiosta.



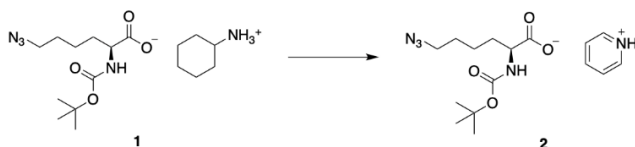
Kuva 5. Yksinkertaistetut mallit syntetisoitujen pallonukleiidihappojen komplementaarisuudesta HER2-geenin kanssa. CLA = COSS-lysiini-arginiini.

Pallonukleiidihappojen kykyä katalysoida HER2-geenin hydrolyysiä tutkittiin syntetisoidun organokatalyytin kanssa. Tutkimuksen päätavoitteena oli selvittää, nopeuttaako komplementaaristen juosteiden liittäminen katalyyttiin kohde-RNA:n pilkkoutumista. Hypoteesina oli, että reaktio nopeutuu, sillä komplementaariset juosteet tuovat kohde-RNA:n lähelle katalyyttiä, mikä nopeuttaisi pilkkoutumista.

2 Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1 Lysiinin ioninvaihto

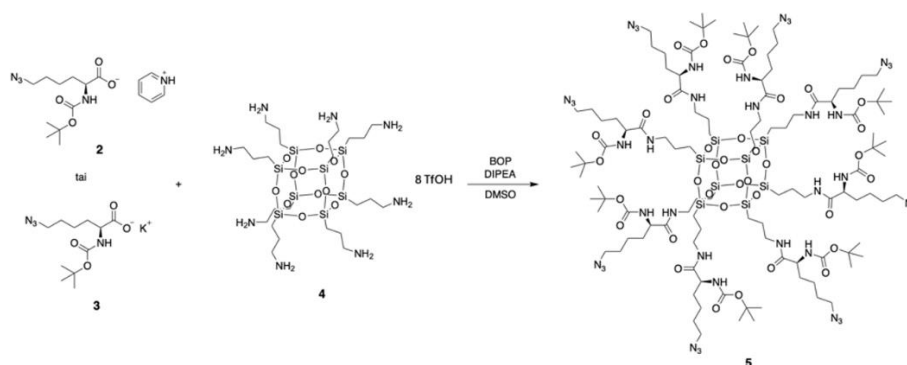
6-Atsido-*N-tert*-butyylioksidikarbonyyli (Boc)-norleusiini·CHA **1** käsiteltiin pyridinium-Dowex -ioninvaihtohartsilla ja saatiin haluttu tuote **2** (Kaavio 4). Tuotteen saanto 77,7 mg (55 %) jäi melko alhaiseksi, mikä voi johtua siitä, että lysiinin suodatus ei ollut täysin kvantitatiivinen.



Kaavio 4. Lysiinin ioninvaihto.

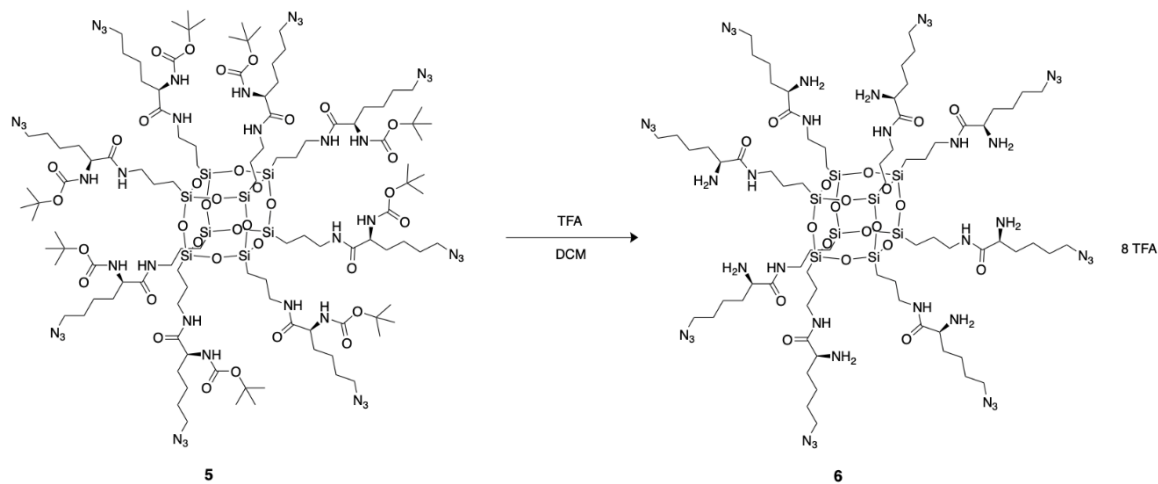
2.2 COSS-lysiini -synteesi

Boc-ryhmällä suojattu lysiinilähtöaine **2** liitettiin amidikytkennällä COSS-keskusrakenteeseen käyttäen BOP-kytkentäreagenssia (BOP, bentsotriatsoli-1-yloksitris(dimetyyliamino)fosfoniheksafluorofosfaatti) ja di-isopropyylietyyliamiinia (DIPEA) emäksenä (Kaavio 5). Reaktiota seurattiin ohutkerroskromatografisesti (TLC). TLC:n tulosten perusteella raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Tuotteen **5** saanto oli 53,6 mg (105 %). Saanto oli yli teoreettisen liuotinjäämien takia. Reaktio toistettiin isommalla skaalalla käyttäen lähtöaineena kaupallista lysiiniä **3**, joka oli kaliumsuolana. Silikageelikromatografian lisäksi tuote puhdistettiin tällä kertaa myös asetonitriilisaostuksella, koska NMR:llä havaittiin epäpuhtauksista johtuvia ylimääräisiä protonisignaaleja alueella 7,49–7,88 ppm. Reaktion saanto oli 70,0 mg (48 %).



Kaavio 5. Yhdisteen **5** synteesi

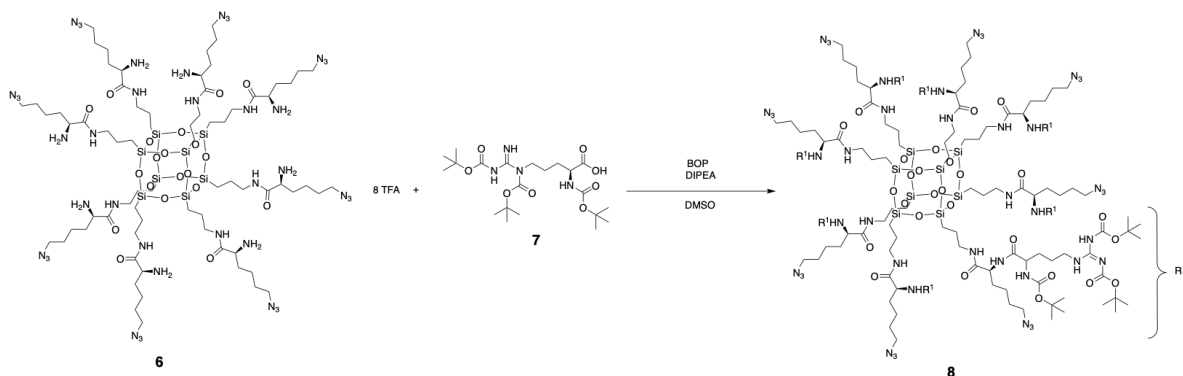
Lähtöaineesta **5** poistettiin Boc-suojaryhmät trifluoretikkahapolla (TFA) (Kaavio 6). Reaktiota seurattiin TLC:llä. Raakatuote puhdistettiin eetterisaostuksella. Tuotteen **6** saanto oli 51,9 mg (93 %). Reaktio toistettiin isommalla skaalalla, jolloin saannoksi saatiin 72,4 mg (99 %).



Kaavio 6. Yhdisteen **6** synteesi

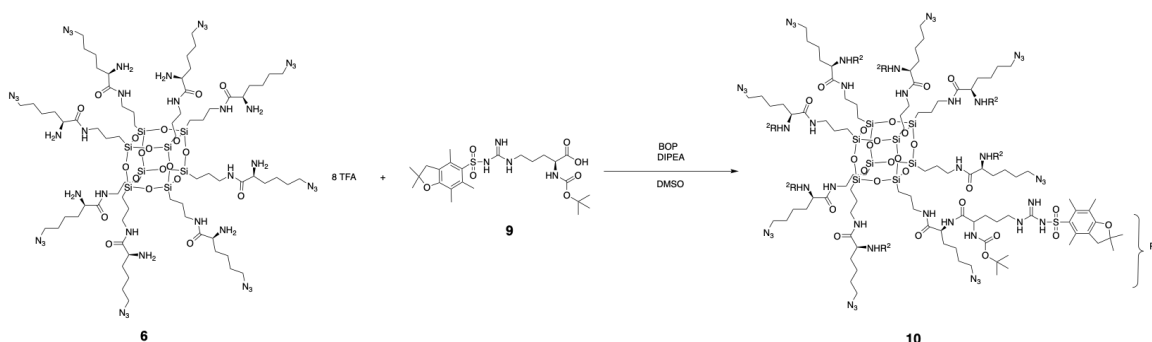
2.3 COSS-lysiini-arginiini -synteesi

Seuraavassa vaiheessa liitettiin arginiini COSS-lysiini -yhdisteeseen **6**. Tarkoituksena oli myös selvittää kumpi suojaryhmästrategioista, Boc-Arg (Boc)₂-OH vai Boc-Arg(Pbf)-OH, toimii paremmin synteesissä. Lähtöaineeseen **6** liitettiin Boc-suojattu arginiini **7** amidikytkennällä käyttäen BOP-kytkentäreagenssia ja DIPEA:a emäksenä (Kaavio 7). Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä. Raakatuote puhdistettiin vesi-dietyylieetteri -uutolla sekä silikageelikromatografisesti. Tuotteen **8** saanto 11,5 mg (60 %). Reaktio toistettiin isommalla skaalalla, jolloin saanto oli 50,3 mg (89 %).



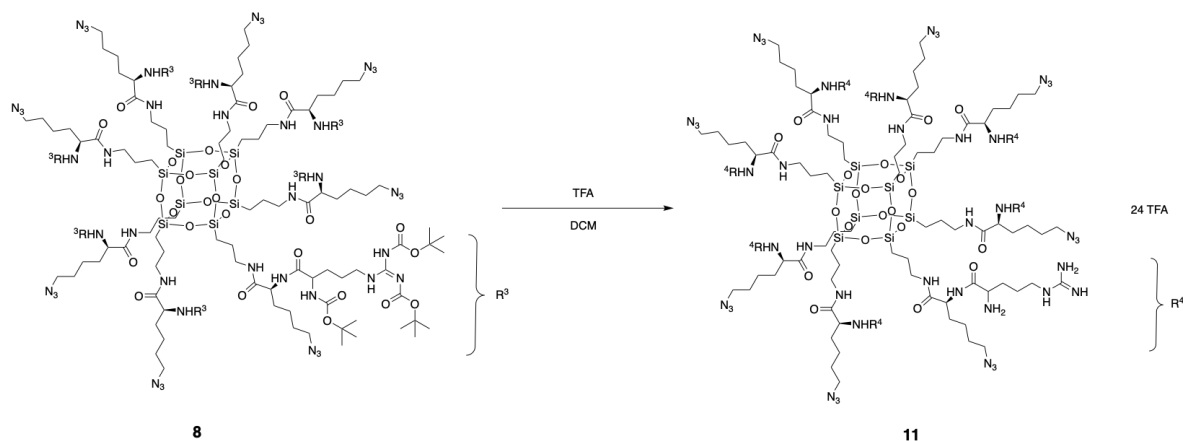
Kaavio 7. Yhdisteen **8** synteesi

Lähtöaineeseen **6** liitettiin Pbf-suojattu arginiini **9** amidikytkennällä käyttäen BOP-kytkentäreagenssia ja DIPEA:a emäksenä (Kaavio 8). Reaktiota seurattiin TLC:llä. Ensimmäinen yritys liittää Pbf-suojattu arginiini osaksi COSS-lysiini -yhdistettä epäonnistui. Tässä synteesissä raakatuote yritettiin puhdistaa vesi-dietyylieetteri -uutolla, jolloin syntyi runsaasti liukenematonta sakkaa, joka TLC:n perusteella ei ollut haluttu tuote. Eetterifaasista kuiviin haihdutettu oletettu raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. ^1H NMR:n perusteella silikageelikromatografiasta eluoitunut tavara ei ollut haluttua tuotetta. Reaktio aloitettiin alusta, mutta tällä kertaa raakatuotetta ei kuitenkaan puhdistettu vesi-dietyylieetteri -uutolla, vaan reaktioliuos kylmäkuivattiin. Tämän jälkeen raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Tuotteen saanto oli 20,6 mg (106 %). Tuotteen saanto oli yli teoreettisen liuotinjäämien takia. Lisäksi ^1H NMR:n mukaan tuote sisälsi puhdistuksen jälkeenkin vielä jonkin verran epäpuhtauksia.



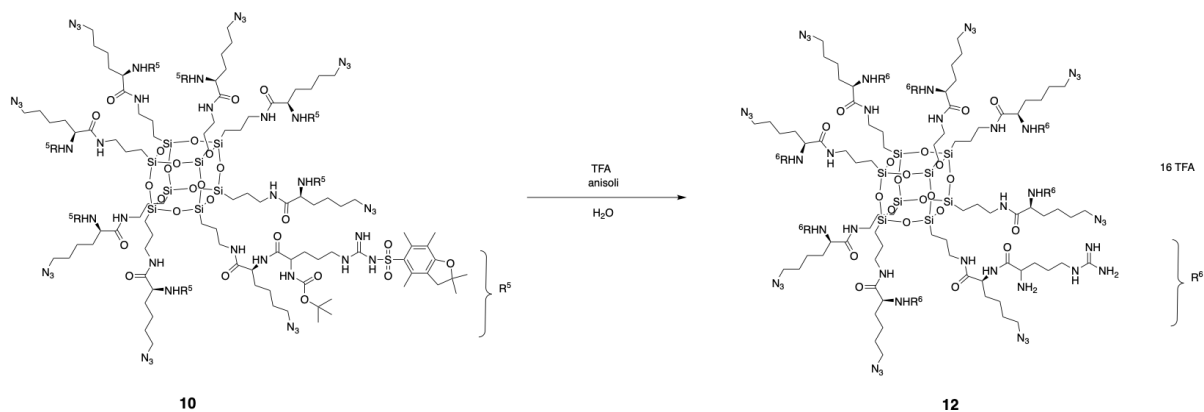
Kaavio 8. Yhdisteen **10** synteesi.

Yhdisteestä **8** poistettiin Boc-suojaryhmät TFA-liuoksella (Kaavio 9). Reaktiota seurattiin TLC:llä. Raakatuote puhdistettiin dietyylieetterisaostuksella. Tuotteen **11** saanto oli 9,1 mg (75 %). Reaktio toistettiin isommalla skaalalla, jolloin saannoksi saatiin 35,1 mg (66 %). Tuotteiden alhaisista saannoista voidaan päätellä, että eetterisaostus ei ole ollut täysin kvantitatiivinen. Myös supernatantista mitatun ^1H NMR:n perusteella tuotetta jäi eetterifaasiin. Tuotetta yritettiin saada talteen haihduttamalla eetterifaasi kuiviin alipaineessa, jonka jälkeen haihdutusjäännös liuotettiin metanoliin ja tuote saostettiin dietyylieetteristä. Saatu tuote yhdistettiin ensimmäisestä dietyylieetterisaostuksesta saadun tuotteen kanssa. Saannon perusteella tuotetta jäi edelleen eetterifaasiin, joten eetterisaostus toistettiin uudestaan, mutta pidemmällä sentrifugoinnilla. ^1H NMR:n sekä saannon perusteella tuotetta jäi edelleen eetterifaasiin. Tuotetta yritettiin saostaa dietyylieetterin sijaan myös asetonitriilistä, mutta sakkaa ei muodostunut.



Kaavio 9. Yhdisteen **11** synteysi.

Yhdisteen **10** Pbf-suojaryhmät poistettiin TFA:n, anisolin ja veden seoksella (Kaavio 10). Reaktiota seurattiin TLC:llä. Raakatuote puhdistettiin dietyylieetterisaostuksella. Tuotteen **12** saanto oli 2,1 mg (43 %). Reaktio toistettiin, jolloin saannoksi saatiin 3,5 mg (50 %). Saannot jäivät alhaisiksi, mikä voi johtua siitä, että eetterisaostus ei ollut täysin kvantitatiivinen, kuten tuotteen **11** kohdalla todettiin. Saadut tuotteet **12** yhdistettiin ja yhdistetylle tuotteelle tehtiin heksaanipesu NMR-spektreissä näkyneen rasvaepäpuhtauden takia. Heksaanipesun jälkeen saanto oli 3,4 mg (46 %). Yhdistetty tuote ei ollut kovinkaan puhdas ^1H NMR:n perusteella, minkä vuoksi sitä yritettiin puhdistaa vielä uudella eetterisaostuksella, mutta eetterisaostuksesta saatu tuote ei näyttänyt ^1H NMR:n perusteella enää oikealta.



Kaavio 10. Yhdisteen **12** synteysi.

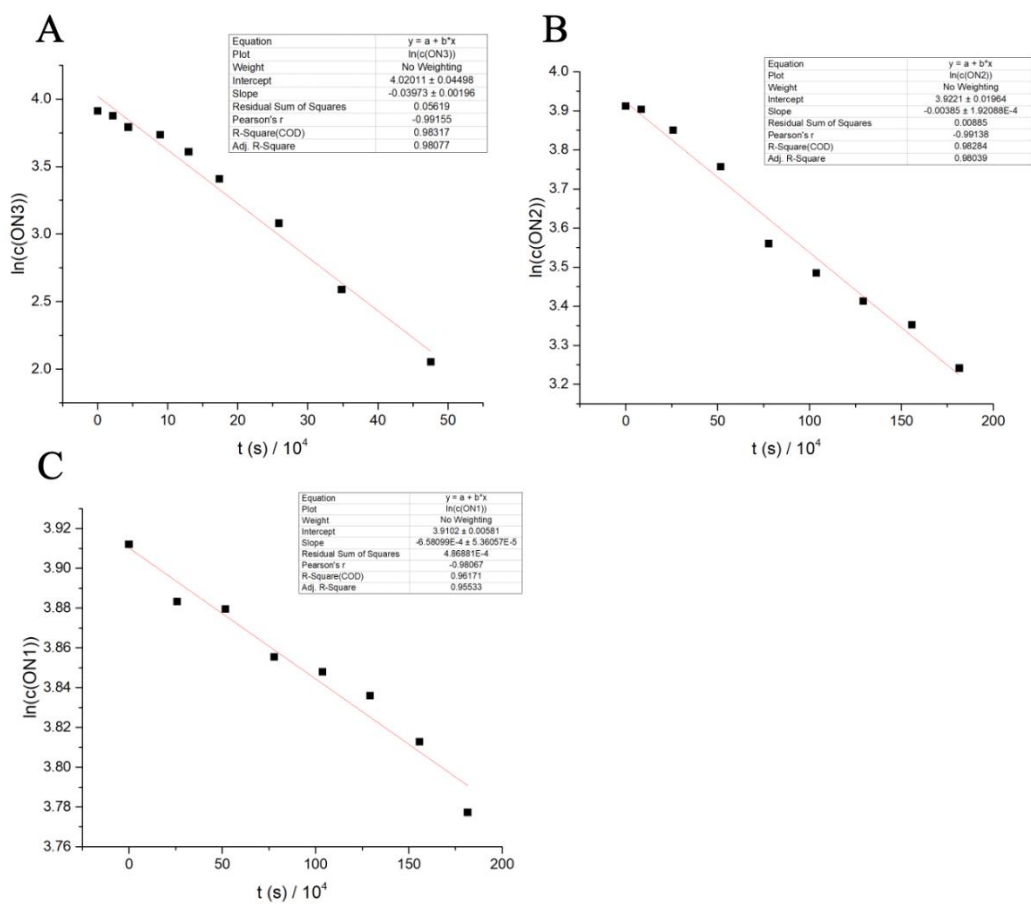
2.4 COSS-lysiini-arginiini -kinetiikkakokeet

Yhdisteen **11** sekä sen mahdollisten Zn^{2+} -, Cu^{2+} - ja Pd^{2+} -koordinaatiokompleksien kykyä katalysoida RNA:n fosfodiesterisidosten hydrolyysiä tutkittiin heksameeristen oligonukleotidien, **ON1**, **ON2**, **ON3** ja **ON4** (Taulukko 1), kanssa. Reaktioissa käytettiin sisäisenä standardina 4-nitrobentseenisulfonihappoa (0,25 mM) ja puskurina HEPES-puskuria ($c = 0,10$ M, $I = 0,10$ M). Reaktioiden pH oli 7,5 ja reaktiot suoritettiin 35 °C lämpötilassa. Katalyytin konsentraatio reaktioissa oli 25 μ M ja oligonukleotidin konsentraatio oli 50 μ M. Guanidiiniryhmien efektiivinen konsentraatio oli näin ollen 200 μ M, mikä on nelinkertainen ylimäärä kohde-RNA:n konsentraatioon nähden. Reaktioliuosten aloitustilavuus oli 200 μ l, josta otettiin 20 μ l näytteitä sopivin aikavälein. Reaktionäytteet analysoitiin HPLC:llä.

Taulukko 1. Kinetiikkakokeissa käytettyjen heksameerien sekvenssit.

Oligonukleotidi	Sekvenssi
ON1	5'-CAA CAC-3'
ON2	5'-CAA UAC-3'
ON3	5'-CAU UCA-3'
ON4	5'-CUA UCA-3'

Heksameerien hydrolysoituminen noudatti ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa, minkä vuoksi ensimmäisen asteen nopeusvakio saatiin suoraan kuvaajasta $\ln(c(\text{ON}))$ vs. $t(s)$ (Kuva 6). Nopeusvakiosta saatiin määritettyä heksameerien hydrolysoitumisen puoliintumisajat (Taulukko 2). Tulosten perusteella yhdiste **11** toimii parhaiten organokatalyyttinä. Pd^{2+} -ionia sisältävät reaktiot sakkaantuivat, joten heksameerien puoliintumisaikoja ei saatu määritettyä kyseisen katalyytin kanssa.



Kuva 6. Heksameerien hydrolysoitumisreaktioiden 1. kertaluvun reaktiokinetiikan kuvaaja $\ln(c(\text{ON}))$ vs. $t(\text{s})$. A) Yhdisteen **11** katalysoima **ON3**:n hajoaminen. B) Yhdisteen **11** Zn^{2+} -kompleksin katalysoima **ON2**:n hajoaminen. C) Yhdisteen **11** Cu^{2+} -kompleksin katalysoima **ON1**:n hajoaminen.

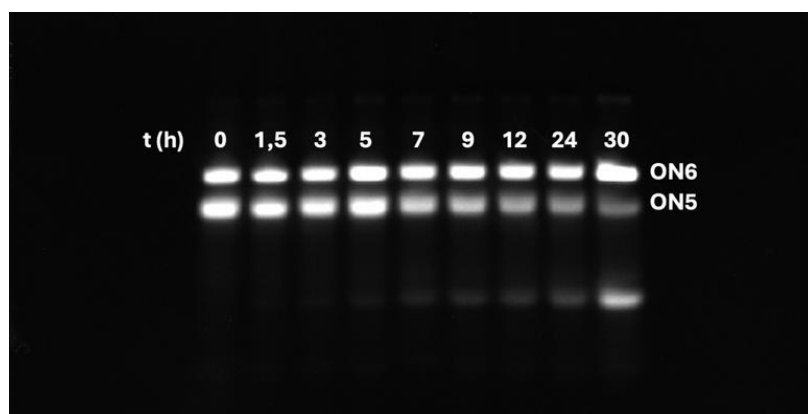
Taulukko 2. Heksameerien hydrolysoitumisen puoliintumisajat virherajoineen.

Katalyytti	ON			
	ON1	ON2	ON3	ON4
11	170 h ± 12 h	180 h ± 14 h	48 h $\pm 2,7$ h	240 h ± 20 h
11-Zn²⁺	650 h ± 31 h	500 h ± 25 h	270 h ± 11 h	320 h $\pm 8,2$ h
11-Cu²⁺	~3000 h	~3000 h		

Yhdiste **11** toimi parhaiten organokatalyyttinä, joten seuraavaksi tarkasteltiin yhdisteen **11** kykyä katalysoida fluoreskeinilla leimatun HER2-geenin (**ON5**) (Taulukko 3) hydrolyysiä. Reaktioissa käytettiin sisäisenä standardina fluoreskeinilla leimattua 2'-OMe-RNA-juostetta (**ON6**) (Taulukko 3). Reaktioiden pH oli 7,5 ja reaktiot suoritettiin 35 °C lämpötilassa. Katalyytin **11** konsentraatio reaktioissa oli 25 µM ja oligonukleotidin (**ON5**) konsentraatio oli 50 µM. Standardin (**ON6**) konsentraatio oli 25 µM. Puskurina reaktiossa käytettiin HEPES-puskuria ($c = 0,10 \text{ M}$, $I = 0,10 \text{ M}$). Reaktioiden aloitustilavuus oli 40 µl, josta otettiin 4 µl näytteitä sopivin aikavälein. Näytteet analysoitiin denaturoivalla polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE) käyttäen 15 % TBE-urea -geelejä ja ajoliuoksena 1×TBE-puskuria (Kuva 7).

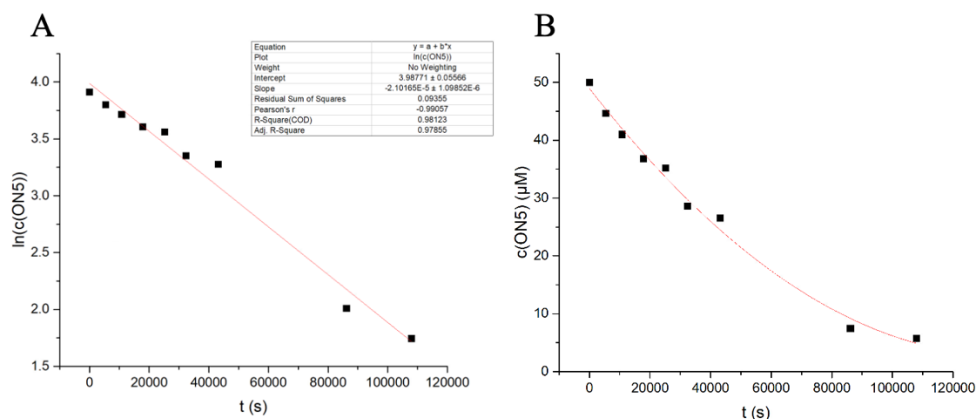
Taulukko 3. HER2-geenin sekä sisäisen standardin sekvenssit.

Oligonukleotidi	Sekvenssi
ON5	5'-6 FAM GUG AGC ACC AUG GAG-3'
ON6	5'-6 FAM (2'-OMe) _{A21} -3'



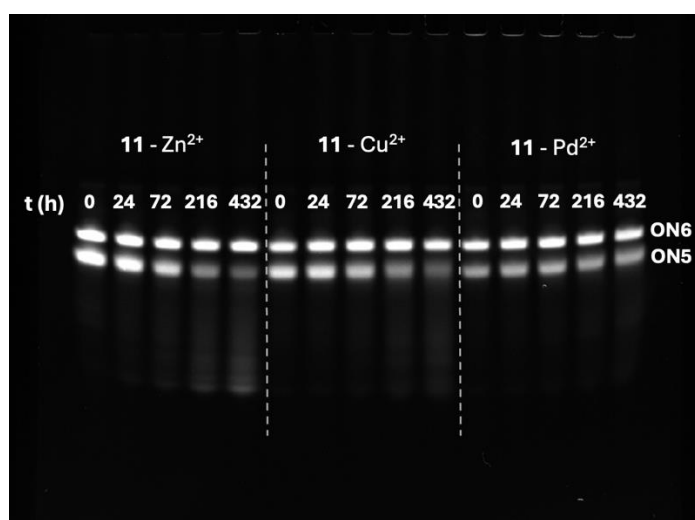
Kuva 7. Yhdisteen **11** katalysoima HER2-geenin (**ON5**) hajoaminen PAGE:lla.

ON5:n hydrolysoituminen noudatti ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa, minkä vuoksi ensimmäisen asteen nopeusvakio saatiin kuvaajan $\ln(c(\text{ON}))$ vs. $t(\text{s})$ kulmakertoimesta (Kuva 8). Nopeusvakiosta saatiin määritettyä HER2-geenin hydrolysoitumisen puoliintumisaika, joka oli $10 \text{ h} \pm 0,52 \text{ h}$. Tämä oli huomattavasti nopeampi, kuin heksameerien puoliintumisaikat.



Kuva 8. Yhdisteen **11** katalysoima HER2-geenin (**ON5**) hajoaminen. A) $\ln(c(\text{ON5}))$ vs. $t(\text{s})$ - kuvaaja. B) $c(\text{ON5})$ (μM) vs $t(\text{s})$ - kuvaaja.

Yhdisteen **11** mahdollisten Zn^{2+} -, Cu^{2+} - ja Pd^{2+} -koordinaatiokompleksien kykyä hydrolysoida **ON5**:ta ei seurattu yhtä tarkasti kuin **11** tapauksessa, koska ne osoittautuivat niin hitaiksi heksameerien hydrolysoinnissa. Reaktioita seurattiin kolmen viikon ajan vastaavissa olosuhteissa kuin **11** kanssa, mutta vain viidellä aikapisteellä. Näytteet analysoitiin vastaavasti denaturoivalla PAGE:lla (Kuva 9). Tulokset osoittivat, että katalyysireaktiot metalli-ionien kanssa ovat myös **ON5**:n kanssa huomattavasti hitaampia, kuin pelkällä organokatalyytillä **11**. Metallioneista sinkillä oli vähiten hidastava vaikutus. Tällöin **ON5**:n hydrolysoitumisen puoliintumisaika oli $278 \text{ h} \pm 28 \text{ h}$. Seuraavaksi nopein reaktio havaittiin kupari-ionin kanssa ($465 \text{ h} \pm 73 \text{ h}$). Palladiumia sisältävässä reaktiossa ei tapahtunut lainkaan hydrolysoitumista.

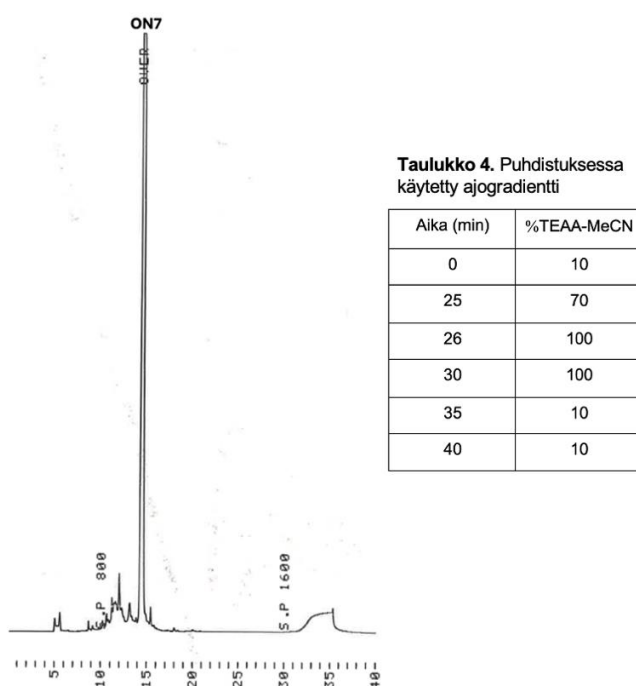


Kuva 9. Yhdisteen **11** Zn^{2+} -, Cu^{2+} - ja Pd^{2+} -kompleksien HER2-geenin (**ON5**) katalyysireaktioiden kolmen viikon seurantojen näytteet PAGE:lla.

2.5 HER2-geenin (ON5) komplementaariset oligonukleotidit

2.5.1 Oligonukleotidi ON7

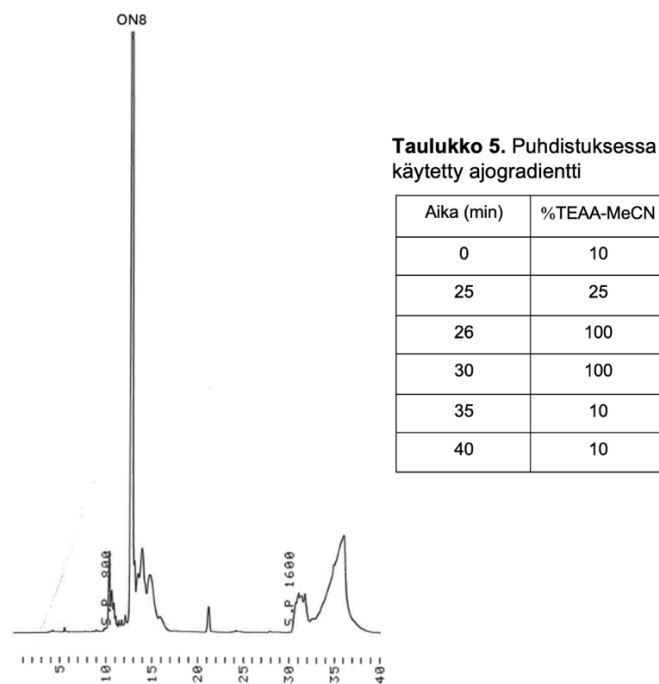
Tutkimusryhmässä valmiiksi syntetisoitu ja BCN:llä konjugoitu oligonukleotidi **ON7** (sekvenssi 5'-BCN GU GCU CAC-3') puhdistettiin HPLC:llä (Kuva 10). Käytetty ajogradientti on esitetty taulukossa 4. Tuotefraktiot kerättiin talteen ja kylmäkuivattiin. Tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti. Massaspekttrissä havaittiin epäpuhtausmassa (5982,29 Da), josta ei päästy puhdistuksella eroon. Epäpuhtauden määrä oli kuitenkin hyvin pieni. Oligonukleotidin **ON7** määrä määritettiin UV-spektrofotometrisesti. **ON7**:n määrä oli 0,48 μmol .



Kuva 10. BCN-konjugoidun oligonukleotidin **ON7** HPLC-profiili ennen puhdistamista.

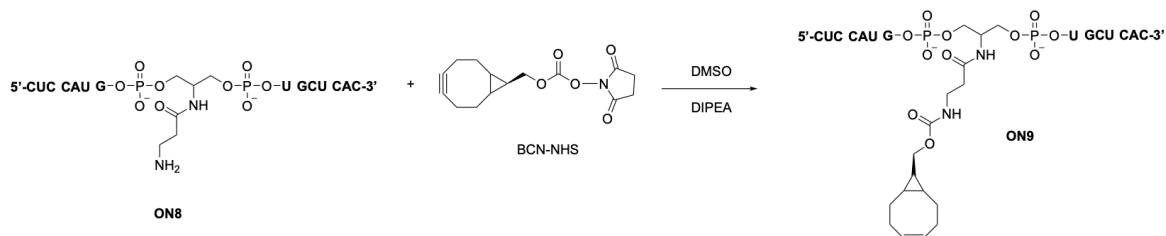
2.5.2 Oligonukleotidien **ON8** ja **ON9** synteesit

Oligonukleotidi **ON8** (sekvenssi 5'-CUC CAU GXU GCU CAC-3', X = amino-modifioitu serinoli) syntetisoitiin kiinteän kantajan, automatisoidulla oligonukleotidisynteesillä. Synteesissä käytettiin 2'-OMe-RNA-fosforamiditteja. Valmis oligonukleotidi irrotettiin kiinteältä kantajalta ammonolyysillä. Raakatuote puhdistettiin HPLC:llä (Kuva 11). Käytetty ajogradientti on esitetty taulukossa 5. Tuotteen saanto määritettiin UV-spektrofotometrisesti. **ON8**:n saanto oli 0,77 μmol (26 %).

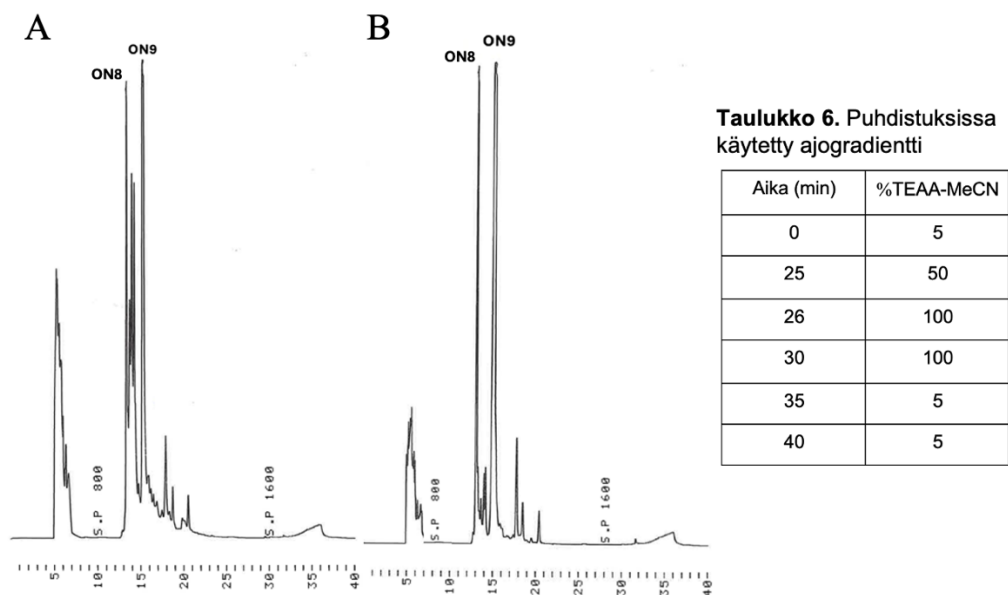


Kuva 11. Oligonukleotidin **ON8** HPLC-profiili ennen puhdistamista.

Puhdistettuun oligonukleotidiin **ON8** konjugoitiin BCN-ryhmä käyttäen BCN-NHS -esteriä liuotettuna kuivaan DMSO:hon ja DIPEA:a emäksenä (Kaavio 11). Vastaavia reaktioita suoritettiin kaksi, joista toista lämmitettiin 40°C asteessa ja toinen reaktio suoritettiin huoneenlämmössä. Lämmitetyssä reaktiossa BCN-NHS -esteriä ja DIPEA:a lisättiin reaktioluokseen 15 eq oligonukleotidiin nähden ja huoneenlämmössä suoritetussa reaktiossa 10 eq oligonukleotidiin nähden. Raakatuotteet puhdistettiin HPLC:llä (Kuva 12). Käytetty ajogradientti on esitetty taulukossa 6. Fraktiot kerättiin talteen ja kylmäkuivattiin. Tuotefraktiot varmistettiin massaspektrometrisesti ja yhdistettiin. Tuotteen **ON9** saanto oli yhteensä 0,34 μmol (45 %).



Kaavio 11. **ON9**:n synteesi

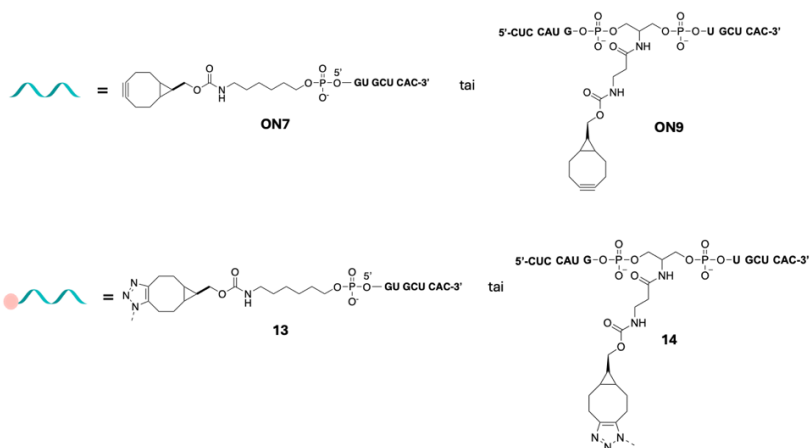
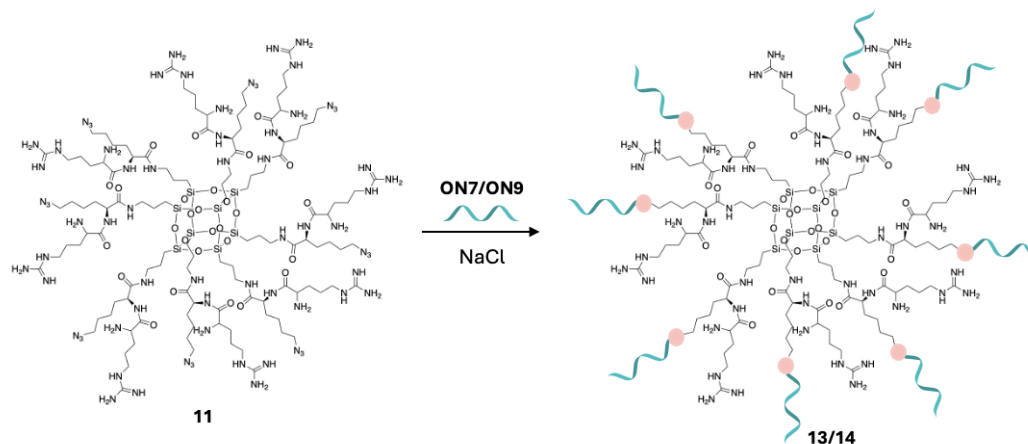


Kuva 12. BCN-konjugoidun oligonukleotidin **ON9** HPLC-profiili ennen puhdistamista. A) Lämmitetyn reaktion puhdistus. B) Huoneenlämmössä olleen reaktion puhdistus.

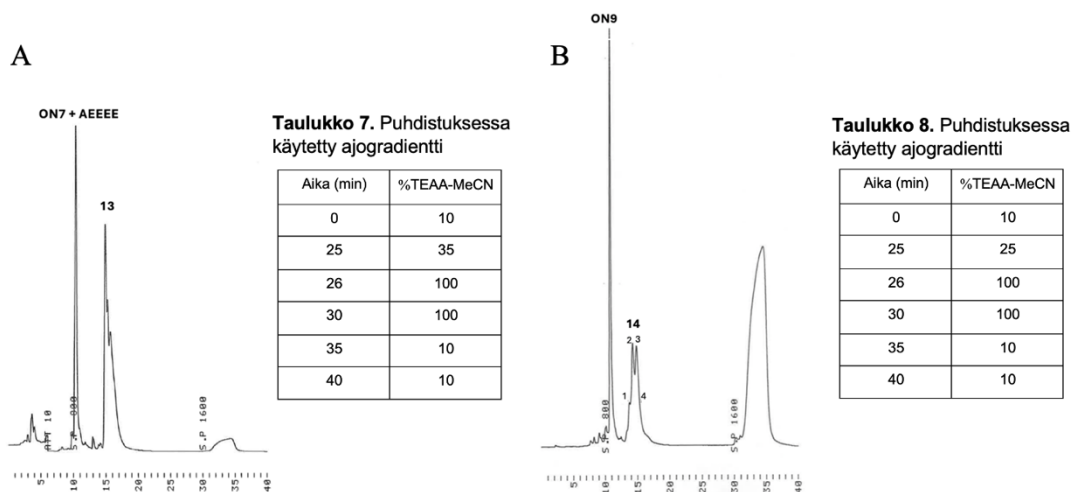
2.6 Pallonukleiinihappojen synteisit

Tutkimuksessa valmistettiin kaksi erilaista pallonukleiinihapporakennetta (**13** ja **14**). Keskusrakenteena pallonukleiinihapossa käytettiin yhdistettä **11** ja oligonukleotidijuosteina BCN-konjugoituja **ON7** ja **ON9**. Keskusrakenteeseen **11** yritettiin liittää ensin selektiivisesti yksi 2'-OMe-RNA-juoste, joko **ON7** tai **ON9**, SPAAC-konjugoinnilla DMSO:ssa. Monofunktionalisaatioiden onnistumista ei kuitenkaan onnistuttu todentamaan HPLC:llä eikä PAGE:lla, minkä vuoksi siirryttiin suoraan täysfunktionalisointeihin. Ensimmäisessä täysfunktionalisoinnissa jokaiseen keskusrakenteen haaraan konjugoitiin yksi 2'-OMe-RNA-juoste **ON7** SPAAC-konjugoinnilla NaCl-suolaliuoksessa nukleasivapaassa vedessä (Kaavio 12). Reaktiota seurattiin RP-HPLC:llä sekä PAGE:lla. Huomattiin, että tuote ja **ON7**-ylimäärä eivät erotu HPLC:llä, joten **ON7**-ylimäärän retentioaikaa pyrittiin siirtämään liittämällä siihen pienmolekyyli. Kun SPAAC-reaktion oli todettu tapahtuneen PAGE:lla, lisättiin reaktioluokseen atsidoetoksietoksietanoli, joka reagoi **ON7**-ylimäärän kanssa ja onnistuneesti siirsi tarpeeksi sen retentioaikaa. Täysfunktionalisoitu tuote **13** puhdistettiin RP-HPLC:llä (Kuva 13). Käytetty ajogradientti on esitetty taulukossa 7. Tuotteen puhtaus varmistettiin myös PAGE:lla (Kuva 14). Tuotteen **13** saanto määritettiin UV-spektrofotometrisesti ja se oli 6,0 nmol (48 %). Tuote onnistuttiin karakterisoimaan

massaspektrometrisesti. Massaspekttrissä oli havaittavissa ON7:n massaspekttrissä esiin tullut epäpuhtausmassa (5982,29 Da).



Kaavio 12. Pallonukleiinihappojen **13** ja **14** synteesit.



Kuva 13. Pallonukleiinihappojen HPLC-profiilit ennen puhdistamista. A) Tuotteen **13** HPLC-profiili. B) Tuotteen **14** HPLC-profiili.

Seuraavassa täysfunktionalisoinnissa keskusrakenteen **11** jokaiseen haaraan konjugoitiin yksi 2'-OMe-RNA-juoste **ON9** SPAAC-konjugoinnilla NaCl-suolaliuoksessa nukleasivapaassa vedessä (Kaavio 12). Reaktion etenemistä seurattiin PAGE:lla ja huomattiin, että reaktio ei etene täysin loppuun asti, vaan mukaan jää myös vajaasti substituotuneita rakenteita. Täysfunktionalisoitu tuote **14** yritettiin saada eristettyä mahdollisimman puhtaana fraktioimalla HPLC-puhdistuksen tuotepiikki useampaan fraktioon (Kuva 13). Käytetty ajogradientti on esitetty taulukossa 8. Tuotefraktioita tarkasteltiin PAGE:lla (Kuva 14), jonka perusteella fraktiot 3 ja 4 sisälsivät eniten täysfunktionalisoitua tuotetta. Myös näissä fraktioissa näkyi kuitenkin vajaita funktionalisointituotteita, etenkin seitsemästi substituotua sekä vähän kuudesti substituotua. Fraktiossa 2 näkyi 8-, 7-, ja 6-substituotuja tuotteita, ja fraktio 1 sisälsi vain 6- ja 5-substituotuja tuotteita. Geelin perusteella kvantitoitiin 8- ja 7-substituotujen tuotteiden suhteelliset määrät. Tämän perusteella fraktioiden 3 ja 4 saannot määritettiin UV-spektrofotometrisesti käyttämällä tuoteseoksen komponenttien absorptiokertoimen (Taulukko 9) suhteellista keskiarvoa (Kaavat 1 ja 2). Fraktion 3 saanto oli 0,8 nmol ja fraktion 4 saanto oli 0,6 nmol (yhteensä 24 %). Tuote onnistuttiin karakterisoidaan massaspektrometrisesti, mutta se ionisoitui todella huonosti.



Kuva 14. Yhdisteet **13** ja **14** PAGE:lla. Ladder: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

Taulukko 9. Pallonukleiinihapon **14** absorptiokertoimet eri substituointiasteille.

Substituointiaste	Absorptiokerroin ε (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)
8x	995 200
7x	870 800
6x	746 400

Kaava 1. Pallonukleiinihapon **14** fraktion 3 absorptiokertoimen laskukaava.

$$\varepsilon(\text{fraktio 3}) = 0,60 \cdot \varepsilon(8x) + 0,32 \cdot \varepsilon(7x) + 0,08 \cdot \varepsilon(6x)$$

Kaava 2. Pallonukleiinihapon **14** fraktion 4 absorptiokertoimen laskukaava.

$$\varepsilon(\text{fraktio 4}) = 0,62 \cdot \varepsilon(8x) + 0,29 \cdot \varepsilon(7x) + 0,07 \cdot \varepsilon(6x)$$

2.7 Sulamislämpötilamittaukset

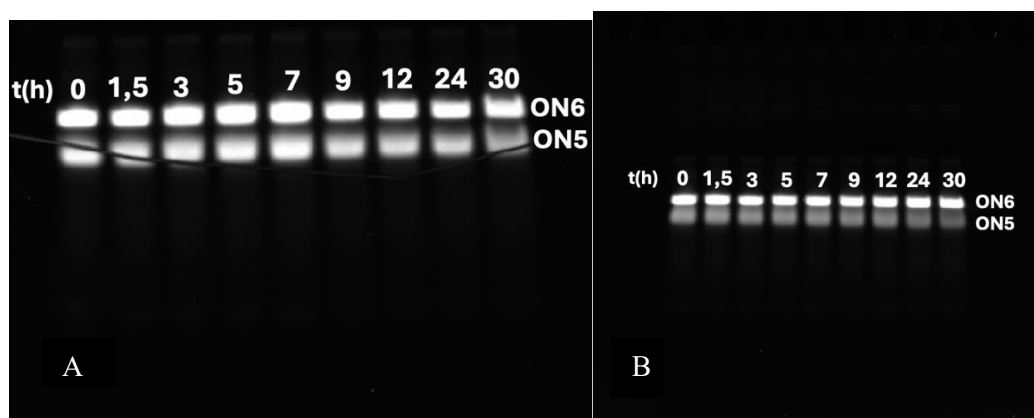
Syntetisoitujen pallonukleiinihappojen kykyä pilkkoa **ON5**:ta haluttiin tutkia seuraavaksi. Tarkoituksena on, että kohde-RNA:n sitoutuminen katalyyttisen osan lähelle komplementaarisen juosteen ansiosta nopeuttaisi reaktiota. Reaktiot suoritetaan samoissa olosuhteissa kuin aiemmat kinetiikkareaktiot eli 35 °C asteen lämpötilassa. Tätä varten tarkistettiin, mitkä ovat tuotteen **13** ja **ON5**:n sekä tuotteen **14** ja **ON5**:n muodostamien sekundäärirakenteiden sulamislämpötilat (Taulukko 10). Näin varmistutaan siitä, että hybridisaatiota on mahdollista hyödyntää reaktioissa. Vertailun vuoksi mitattiin myös **ON7**:n ja **ON5**:n sekä **ON9**:n ja **ON5**:n muodostamien dupleksien sulamislämpötilat (Taulukko 10). Sulamislämpötilamittauksissa käytetyt konsentraatiot olivat: kakodylaattipuskuri (c = 10 mM, pH = 7), NaCl (c = 100 mM), **ON5** (c = 1 μM), oligonukleotidit **ON7** ja **ON9** (c = 1 μM) ja pallonukleiinihapot **13** ja **14** (c = 10 μM). Määritetyt sulamislämpötilat ovat tarpeeksi korkeita siihen, että kinetiikkareaktiot voidaan suorittaa 35 °C asteessa.

Taulukko 10. Dupleksiparit ja niiden mitatut sulamislämpötilat

Dupleksipari	Sulamislämpötila
13 ja ON5	52,9 °C
14 ja ON5	56,5 °C
ON7 ja ON5	48,9 °C
ON9 ja ON5	54,3 °C

2.8 Pallonukleiinihappojen kinetiikkakokeet

Seuraavaksi tutkittiin pallonukleiinihappojen **13** ja **14** kykyä katalysoida fluoreskeinilla leimatun HER2-geenin (**ON5**) hydrolyysiä (Kuva 15). Reaktioissa käytettiin sisäisenä standardina fluoreskeinilla leimattua 2'-OMe-RNA-juostetta (**ON6**). Reaktioiden pH oli 7,5 ja reaktiot suoritettiin 35 °C lämpötilassa. Pallonukleiinihappojen **13** ja **14** konsentraatio reaktioissa oli 25 µM ja oligonukleotidin (**ON5**) konsentraatio oli 50 µM. Standardin (**ON6**) konsentraatio oli 25 µM. Puskurina reaktioissa käytettiin HEPES-puskuria ($c = 0,10$ M, $I = 0,10$ M). Reaktioiden aloitustilavuus oli 40 µl, josta otettiin 4 µl näytteitä sopivin aikavälein. Näytteet analysoitiin denaturoivalla PAGE:lla käyttäen 15 % TBE-urea -geelejä ja ajoliuksena 1×TBE-puskuria.



Kuva 15. HER2-geenin (**ON5**) hajoaminen. A) Yhdisteen **13** katalysoima reaktio. B) Yhdisteen **14** katalysoima reaktio.

Reaktiot noudattivat ensimmäisen kertaluvun reaktiokinetiikkaa, minkä vuoksi ensimmäisen asteen nopeusvakiot saatiin kuvaajien $\ln(c(\text{ON}))$ vs. $t(\text{s})$ kulmakertoimista. Nopeusvakioista saatiin määritettyä HER2-geenin hydrolysoitumisen puoliintumisaikat. Yhdisteen **13** katalysoimassa reaktiossa puoliintumisaika oli $71 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ ja yhdisteen **14** katalysoimassa reaktiossa puoliintumisaika $43 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$.

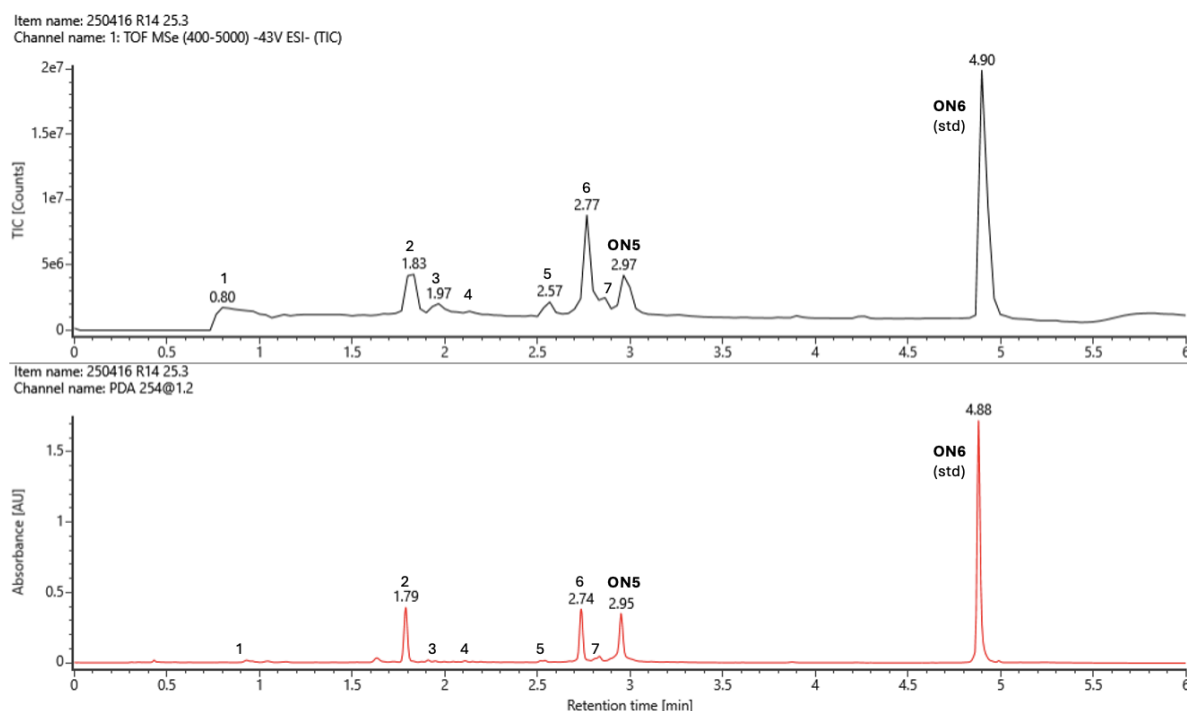
2.9 HER2-geenin katkaisukohtan selvittäminen

Pallonukleiinihappojen kanssa **ON5**:n hydrolyysireaktiot olivat hitaampia kuin pelkällä katalyytillä **11**. Tämän vuoksi haluttiin selvittää, mistä kohdista **ON5** katkeaa katalyytin **11** vaikutuksesta. **ON5**:n hydrolysoitumisen katkaisukohtat (Taulukko 11) määritettiin massaspektrometrisesti viimeisen aikapisteen reaktionäytteestä yhdisteen **11** katalysoimasta reaktiosta. Massa- ja UV-signaalien intensiteettien (Kuva 16) perusteella **ON5**:llä on selkeästi

yksi pääasiallinen katkaisukohta. Se sijaitsee sekvenssin osassa, joka on komplementaarinen pallonukleiinihappojen 2'-OMe-RNA-juosteiden kanssa.

Taulukko 11. HER2-geenin fragmenttien havaitut m/z -arvot sekä katkaisukohdat sekvenssissä. Pääasiallinen katkaisukohta boldattuna.

Signaali	Havaittu m/z (ESI-MS)	Fragmentti	Katkaisukohta
ON5	5388,78	5'-6 FAM GUG AGC ACC AUG GAG-3'	
2	2876,44	5'-ACC AUG GAG-3'	5'-6FAM GUG AGC↓ACC AUG GAG-3'
6	2512,37	5'-6FAM GUG AGC-P-3'	
4	3855,57 4200,57	5'-AGC ACC AUG GAG-3' 5'-G AGC ACC AUG GAG-3'	5'-6FAM GUG↓AGC ACC AUG GAG-3' 5'-6FAM GU↓G AGC ACC AUG GAG-3'
5	1532,21 1187,18	5'-6FAM GUG-P-3' 5'-6FAM GU-P-3'	
1	1936,31	5'-AUG GAG-3'	5'-6FAM GUG AGC ACC↓AUG GAG-3' 5'-6FAM GUG AGC AC↓C AUG GAG-3' 5'-6FAM GUG AGC A↓CC AUG GAG-3'
7	3451,47 3146,42 2841,38	5'-6FAM GUG AGC ACC-P-3' 5'-6FAM GUG AGC AC-P-3' 5'-6FAM GUG AGC A-P-3'	
3	3205,48	5'-UG AGC ACC AU-3'	
			5'-6FAM G↓UG AGC ACC AU↓G GAG-3'



Kuva 16. Massa- ja UV-signaalit **ON5** hydrolysoitumisesta.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Polyoktavalentin arginiinilyysiini-silsekvioksaanikuution synteeseissä tuotteet karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti sekä massaspektrometrisesti. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz Avance III sekä Bruker 500 MHz Avance III, jossa on cryo probe, laitteilla. Massaspektrit mitattiin Waters Acquity RDa HRMS (ESI-TOF) -massaspektrometrillä. Reaktioita seurattiin ohutkerroskromatografisesti (TLC), käyttäen ninhydriinivärijäystä. R_f -arvot on ilmoitettu DCM/MeOH, 95:5, v/v, eluentilla. Osalle tuotteista suoritettiin heksaanipesu, jotta päästäisiin eroon rasvaepäpuhtaudesta, joka ilmeni jokaisen tuotteen kohdalla ^1H NMR-spektreissä 0,84–0,87 ppm ja 1,25 ppm (CDCl_3) sekä 0,86–0,93 ppm ja 1,29 ppm (CD_3OD) alueella.⁶² ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit on kalibroitu käytetyn liuottimen signaalin mukaan⁶², ja ^{29}Si NMR-spektrit on kalibroitu tetrametyylisilaanin (TMS) signaalin (0 ppm) mukaan.

Oligonukleotidien HPLC-puhdistuksissa käytettiin Clarity® Oligo-RP -kolonnia (250 × 10 mm, 5 μm) ja 260 nm detektioaallonpituutta. Pallonukleiinihappojen HPLC-puhdistuksissa käytettiin Aeris™ WIDEPORÉ XB-C8 200 -kolonnia (150 × 4,6 mm, 3,6 μm) ja 260 nm detektioaallonpituutta. HPLC-puhdistuksissa ajoliuoksina käytettiin 50 mM TEAA -liuoksia (pH = 7,0) MilliQ-vedessä sekä asetonitriilissä. Oligonukleotidit ja pallonukleiinihapot karakterisoitiin massaspektrometrisesti Waters Acquity RDa HRMS (ESI-TOF) -laitteella. Samaa laitetta käytettiin myös HER2-geenin hydrolysoitumisen katkaisukohtien määrittämiseen. Oligonukleotidien ja pallonukleiinihappojen saannot määritettiin UV-spektrofotometrisesti 260 nm aallonpituudella. Saantojen määrittämisessä käytetyt absorptiokertoimien arvot on esitetty taulukossa 12. Oligonukleotidien ja pallonukleiinihappojen sulamislämpötilat mitattiin lämmittämällä näytteitä PerkinElmer PTP 6+6 Peltier Temperature Programmer -laitteistolla ja mittaamalla UV-absorbanssi PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS -laitteistolla. Sulamislämpötilamittauksissa käytetyt konsentraatiot olivat: kakodylaattipuskuri (c = 10 mM, pH = 7), NaCl (c = 100 mM), **ON5** (c = 1 μM), oligonukleotidit **ON7** ja **ON9** (c = 1 μM) ja pallonukleiinihapot **13** ja **14** (c = 10 μM). Pallonukleiinihappojen geelielektroforeesitarkasteluissa käytettiin kaupallisia 6 % Novex TBE-geelejä ja 1×TBE (90 mM Tris, 90 mM boraatti, 2 mM EDTA, pH 8,3) -puskuri ajoliuoksena. Ajoaika oli 25 min ja ajossa käytettiin 200 V jännitettä ja 45 mA sähkövirtaa. Geelit värjättiin SYBR Gold -väriaineella ja kuvattiin Syngene-laitteistolla. Pallonukleiinihappojen

geelinäytteissä 1 µl:aan yhdisteen **13** tai **14** laimennettuun vesiliuokseen ($c = 2,5 \mu\text{M}$) lisättiin 2 µl Novex Hi-Density TBE 5×-näytepuskuria sekä 7 µl MilliQ-vettä, ja geelikaivoihin pipetoitiin 10 µl näytettä. Pallonukleiinihappojen reaktioiden seurannassa pallonukleiinihappoja verrattiin geelillä pelkkiin oligonukleotideihin **ON7** ja **ON9**. Oligonukleotidien geelinäytteissä 2 µl:aan **ON7**:n tai **ON9**:n laimennettuun vesiliuokseen ($c = 2,5 \mu\text{M}$) lisättiin 2 µl Novex Hi-Density TBE 5× -näytepuskuria sekä 6 µl MilliQ-vettä. Geelikaivoihin pipetoitiin 10 µl näytettä.

Taulukko 12. UV-spektrofotometrisesti määritetyissä saannoissa käytetyt absorptiokertoimet.

Tuote	Absorptiokerroin ϵ ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
ON7	72 900
ON8	124 400
ON9	124 400
13	583 200
14	935 488 (fraktio 3) 936 732 (fraktio 4)

3.2 Polyoktavalentin arginiinilyysiini-silsekvioksaanikuution synteesi

3.2.1 Yhdisteen **2** synteesi

Dowex 50 w \times 8 H⁺ (200–400 mesh) hartsia pestiin lasisinterissä 1 M HCl-liuoksella (100 ml), vedellä (100 ml) sekä metanolilla (100 ml). Viimeisenä hartsi pestiin vielä pyridiinillä (300 ml). 6-Atsido-N-Boc-L-norleusiini·CHA **1** (148,8 mg) liuotettiin metanoliin (20 ml). Reaktioseokseen lisättiin pyridinium-Dowex -ioninvaihtohartsia. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä 4 h, jonka jälkeen reaktioseos suodatettiin. Suodoksesta haihdutettiin liuotin pois alipaineessa. Tuotteen **2** saanto oli 77,7 mg (55 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,64$ (2H, d, $J = 4,5$ Hz, H12), 7,83 (1H, tt, $J = 7,7$ Hz, 1,8 Hz, H14); 7,65 (1H, br, H11); 7,42 (2H, m, H13); 5,97 ja 5,21 (1H, m, H6); 4,32-4,14 (1H, m, H5); 3,27 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, H1); 1,90 (1H, m, H4'); 1,72 (1H, m, H4''); 1,62 (2H, m, H2); 1,47 (2H, m, H3); 1,44 (9H, s, H9). ¹³C{¹H}NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 175,9$ (C10); 155,7 (C7); 147,7 (C14); 138,2 (C12); 124,6 (C13); 80,0 (C8); 53,4 (C5); 51,3 (C1); 32,4 (C4); 28,6 (C2); 28,4 (C9); 22,6 (C3).

3.2.2 Yhdisteen **5** synteesi

COSS-keskusrakenne **4** (1 ekv.; 17,5 μmol ; 36,3 mg), lysyiini **2** (1,5 ekv. per haara, yht. 12 ekv.; 209,4 μmol ; 77,7 mg) ja BOP (1,1 ekv. suhteessa lysyiiniin; 230,4 μmol ; 138,8 mg) liuotettiin DMSO:iin (5 ml). Reaktioliuokseen lisättiin DIPEAa (3,3 ekv. suhteessa lysyiiniin; 691,1 μmol ; 164 μl). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 95:5, v/v, ninhydriinivärjäys). Reaktioliuos kylmäkuivattiin ja puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 95:5, v/v). Liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa. Tuotteen **5** saanto oli 53,6 mg (105 %). R_f -arvo = 0,37.

COSS-keskusrakenne **4** (1 ekv.; 49,5 μmol ; 103 mg), Boc-L-Lys(N₃)-OK **3** (1,5 ekv. per haara, yht. 12 ekv.; 595 μmol ; 185 mg) ja BOP (1,1 ekv. suhteessa lysyiiniin; 654 μmol ; 289 mg) liuotettiin DMSO:iin (15 ml). Reaktioliuokseen lisättiin DIPEAa (3,3 ekv. suhteessa lysyiiniin; 1,96 mmol; 342 μl). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 95:5, v/v, ninhydriinivärjäys). Reaktioliuos kylmäkuivattiin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 95:5, v/v). Liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa. Tuote liuotettiin DCM:iin ja saostettiin asetonitriilistä (40 ml) ja sakka sentrifugoitiin (4000 min^{-1} , 10 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin DCM:iin. Tuotteen puhtautta tarkasteltiin TLC:llä (DCM/MeOH, 95:5, v/v, ninhydriinivärjäys sekä DCM/MeOH, 93:7, v/v, ninhydriinivärjäys), jonka perusteella tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 93:7, v/v). Tuote liuotettiin DCM:iin ja saostettiin asetonitriilistä (40 ml) ja sakka sentrifugoitiin (1. 4000 min^{-1} , 10 min; 2. 4000 min^{-1} , 10 min; 3. 4000 min^{-1} , 20 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin DCM:iin. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuotteelle suoritettiin heksaanipesu, jonka jälkeen tuote kuivattiin vakuumieksikkaattorissa yön yli. Tuotteen **5** saanto oli 70,0 mg (48 %). R_f -arvo = 0,39. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 7,65 (1H, s, H4); 5,90 (1H, d, J = 6,1 Hz, H11); 4,27 (1H, m, H6); 3,29 (1H, m, H3'); 3,24 (2H, t, J = 6,8 Hz, H10); 3,05 (1H, m, H3''); 1,68 (2H, m, H7); 1,60 (4H, m, H2 ja H9); 1,46 (2H, m, H8); 1,40 (9H, s, H14) ja 0,63 (2H, m, H1). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3) : δ = 172,79 (C5); 156,26 (C12); 79,65 (C13); 54,22 (C6); 51,24 (C10); 41,82 (C3); 32,71 (C7); 28,53 (C9); 28,35 (C14); 23,00 (C8); 22,85 (C2); 9,08 (C1). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR (99,35 MHz, CDCl_3) : δ = -66,69. ESI⁺-MS: m/z 2914,36 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (havaittu), m/z 2914,39 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (laskettu), m/z 1457,68 [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺ (havaittu), m/z 1457,70

$[M+2H]^{2+}$ (laskettu), m/z 972,10 $[M+3H]^{3+}$ (havaittu), m/z 972,13 $[M+3H]^{3+}$ (laskettu), m/z 2936,35 $[M+Na]^+$ (havaittu), m/z 2936,37 $[M+Na]^+$ (laskettu).

3.2.3 Yhdisteen **6** synteesi

Lähtöaine **5** liuotettiin DCM:iin (6 ml) ja liuoksen joukkoon lisättiin TFA:a (2 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 h. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 93:7, v/v , ninhydriinivärijäys). Tuote saostettiin lisäämällä reaktioliuos tipoitain jäädytettyyn dietyylieetteriin (40 ml) ja sakka sentrifugoitiin (4000 min^{-1} , 10 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin metanoliin. Liuotin haihdutettiin alipaineessa. Tuotteelle tehtiin kolme heksaanipesua ja liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuotetta kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa viikonlopun yli. Tuotteen **6** saanto oli 72,4 mg (99 %). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) : $\delta = 3,88$ (1H, t, $J = 6,6$ Hz, H6); 3,34 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, H10); 3,29-3,16 (2H, m, H3); 1,88 (2H, m, H7); 1,65 (4H, m, H2 ja H9); 1,49 (2H, m, H8); 0,68 (2H, t, $J = 8,15$ Hz, H1). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_3OD) : $\delta = 170,08$ (C5); 163,44-162,62 (C12); 121,75-114,76 (C13); 54,41 (C6); 52,06 (C10); 43,13 (C3); 32,22 (C7); 29,47 (C9); 23,73 (C2); 23,23 (C8); 10,11 (C1). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR (99,35 MHz, CD_3OD) : $\delta = -66,57$. ESI⁺-MS: m/z 2113,95 $[M+H]^+$ (havaittu), m/z 2113,97 $[M+H]^+$ (laskettu), m/z 1057,48 $[M+2H]^{2+}$ (havaittu), m/z 1057,49 $[M+2H]^{2+}$ (laskettu), m/z 705,31 $[M+3H]^{3+}$ (havaittu), m/z 705,33 $[M+3H]^{3+}$ (laskettu), m/z 529,25 $[M+4H]^{4+}$ (havaittu), m/z 529,25 $[M+4H]^{4+}$ (laskettu).

3.2.4 Yhdisteen **8** synteesi

Lähtöaine **6** (9,83 μmol ; 29,8 mg), Boc-Arg(Boc)2-OH **7** (118,0 μmol ; 56,0 mg) ja BOP (130 μmol ; 57,4 mg) liuotettiin DMSO:iin (10 ml). Reaktioliuokseen lisättiin DIPEAa (390 μmol ; 67,8 μl). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 95:5, v/v , ninhydriinivärijäys) eetteriuuton kautta. Reaktioliuoksen joukkoon lisättiin vettä (20 ml) ja vesifaasia uutettiin dietyylieetterillä (10 ml). Eetterifaasista haihdutettiin liuotin alipaineessa. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 95:5, v/v). TLC:n (DCM/MeOH, 95:5, v/v , ninhydriinivärijäys) perusteella tuote sekä epäpuhtaus eluoituivat samanaikaisesti, joten tuote puhdistettiin uudelleen silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 98:2, v/v), jolloin epäpuhtaus eluoitui ensimmäisenä. Tämän jälkeen metanolin pitoisuus nostettiin 5 %, jolloin tuote eluoitui. Tuotefraktiot yhdistettiin ja liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa. Tuote kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa yön yli. Tuotteen **8** saanto oli 50,3 mg (89 %). R_f -arvo = 0,25. ^1H

NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 11,47 (1H, s, H19); 8,35 (1H, t, J = 5,2 Hz, H17); 7,49 (1H, br, H4); 7,28 (1H, br, H11); 5,87 (1H, br, H23); 4,54 (1H, m, H6); 4,12 (1H, m, H13); 3,39 (2H, m, H16); 3,24 (2H, t, J = 6,8 Hz, H10); 3,16 (2H, m, H3); 1,88-1,77 (2H, m, H7' ja H14'); 1,70 (4H, m, H7'', H14'' ja H15); 1,60 (4H, m, H2 ja H9); 1,52-1,39 (29H, m, H8 ja H22); 0,63 (2H, m, H1). ¹³C{¹H}NMR (126 MHz, CDCl₃) : δ = 172,42 (C12); 171,51 (C5); 163,47 (C18); 156,23 (C20); 155,82 (C20); 153,20 (C20); 83,11 (C21); 79,96 (C21); 79,29 (C21); 54,86 (C13); 52,90 (C6); 51,15 (C10); 42,03 (C3); 40,39 (C16); 32,38 (C7); 28,54 (C14); 28,35 (C9); 28,32 (C22); 28,07 (C22); 25,79 (C15); 22,71 (C2 ja C8); 9,11 (C1). ²⁹Si{¹H}NMR (99,35 MHz, CDCl₃) : δ = -66,86. ESI⁺-MS: m/z 1922,04 [M+3H]³⁺ (havaittu), m/z 1922,02 [M+3H]³⁺ (laskettu), m/z 1441,75 [M+4H]⁴⁺ (havaittu), m/z 1441,76 [M+4H]⁴⁺ (laskettu), m/z 1153,62 [M+5H]⁵⁺ (havaittu), m/z 1153,61 [M+5H]⁵⁺ (laskettu), m/z 961,50 [M+6H]⁶⁺ (havaittu), m/z 961,51 [M+6H]⁶⁺ (laskettu).

3.2.5 Yhdisteen **10** synteesi

Lähtöaine **6** (3,3 μ mol; 9,5 mg), Boc-Arg(Pbf)-OH **9** (39,6 μ mol; 20,9 mg) ja BOP (43,6 μ mol; 19,9 mg) liuotettiin DMSO:iin (1 ml). Reaktioliuokseen lisättiin DIPEAa (130,8 μ mol; 22,8 μ l). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 90:10, v/v, ninhydriinivärijäys). Reaktioliuos kylmäkuivattiin. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti (DCM/MeOH, 90:10, v/v). Tuotefraktiot yhdistettiin ja liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa. Tuotteen **10** saanto oli 20,6 mg (106 %). R_f-arvo = 0,57. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ = 7,70 (2H, br, NH); 6,50 (3H, br, NH); 4,34 (2H, m, H6 ja H13); 3,21 (6H, m, H3, H10 ja H16); 2,95 (2H, s, H29); 2,59 (3H, m, H22); 2,51 (3H, m, H32); 2,09 (2H, s, 24); 1,79 (4H, m, H7 ja H14); 1,61 (2H, m, H2); 1,59 (4H, m, H9 ja H15); 1,46 (8H, m, H28 ja H8); 1,41 (9H, m, H36); 0,64 (2H, m, H1). ¹³C{¹H}NMR (126 MHz, CDCl₃) : δ = 172,74 (C5 ja C12), 158,81 (C26); 156,68 (C18); 155,93 (C34); 138,32 (C25 tai C23); 132,73 (C21); 132,23 (C31); 124,70 (C30); 117,59 (C25 tai C23); 86,43 (C27); 79,74 (C35); 54,00 (C13, C6); 51,12 (C10); 43,26 (C29); 42,00 (C3); 40,92 (C16); 31,50 (C7); 29,70 (C14); 28,61 (C36); 28,36 (C28); 28,00 (C9); 25,60 (C15); 23,01 (C8); 22,70 (C2) 19,41 (C22); 18,09 (C32); 12,51 (C24); 8,99 (C1). ²⁹Si{¹H}NMR (99,35 MHz, CDCl₃) : δ = -66,64. ESI⁺-MS: m/z 2060,55 [M+3H]³⁺ (havaittu), m/z 2060,62 [M+3H]³⁺ (laskettu), m/z 1545,63 [M+4H]⁴⁺ (havaittu), m/z 1545,72 [M+4H]⁴⁺ (laskettu), m/z 1236,77 [M+5H]⁵⁺ (havaittu), m/z 1236,78 [M+5H]⁵⁺ (laskettu).

3.2.6 Yhdisteen **11** synteesi

Lähtöaine **8** (50,3 mg) liuotettiin DCM:iin (6 ml) ja joukkoon lisättiin TFA:a (2 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 h. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 95:5, v/v, ninhydiinivärjäys). Reaktioliuos saostettiin jäädytetystä dietyylieetteristä (40 ml) ja sentrifugoitiin (4000 min^{-1} , 10 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin metanoliin. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Saanto oli tässä vaiheessa heikko, joten eetterifaasi haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Jäännös liuotettiin metanoliin (5 ml) ja se saostettiin jäädytetystä dietyylieetteristä kuten edellä. Saatu tuote yhdistettiin aiemman eetterisaostuksen tuotteen kanssa. Saannon perusteella tuotetta oli edelleen supernatantissa, joten sentrifugointiaikaa pidennettiin. ^1H NMR:n sekä saannon perusteella tuotetta jäi edelleen eetterifaasiin, minkä vuoksi tuote koitettiin saostaa vielä asetonitriilistä vastaavasti, mutta sakkaa ei muodostunut. Tuotteelle tehtiin kolme heksaanipesua ja liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuote kuivattiin vakuumieksikkaattorissa yön yli. Tuotteen **11** saanto oli 35,1 mg (66 %). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) : $\delta = 4,37$ (1H, m, H6); 4,02 (1H, t, $J = 6,3$ Hz, H13); 3,33 (3H, m, H16 ja H3'); 3,23 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, H10); 3,09 (1H, m, H3''); 1,95 (2H, m, H14); 1,82-1,74 (2H, m, H7); 1,74 (2H, m, H15); 1,62 (4H, m, H2 ja H9); 1,49 (2H, m, H8); 0,67 (2H, d, $J = 4,9$ Hz, H1). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_3OD) : $\delta = 173,81$ (C5); 170,05 (C12); 163,58-162,75 (C22); 158,83 (C18); 121,68-114,71 (C23); 55,17 (C6); 53,85 (C13); 52,33 (C10); 43,20 (C3); 41,83 (C16); 33,04 (C7); 29,75 (C14); 29,61 (C9); 25,22 (C15); 24,25 (C8); 23,76 (C2); 10,27 (C1). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR (99,35 MHz, CD_3OD) : $\delta = -66,55$. ESI⁺-MS: m/z 1681,84 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (havaittu), m/z 1681,89 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (laskettu), m/z 1121,59 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (havaittu), m/z 1121,59 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (laskettu), m/z 841,44 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (havaittu), m/z 841,45 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (laskettu), m/z 673,36 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ (havaittu), m/z 673,36 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ (laskettu).

3.2.7 Yhdisteen **12** synteesi

Lähtöaine **10** (5 mg) liuotettiin TFA/anisoli/vesi (95:2,5:2,5, v/v/v) -liuokseen. Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 3 h. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (DCM/MeOH, 80:20, v/v, ninhydiinivärjäys). Reaktioliuos saostettiin jäädytetystä dietyylieetteristä (12 ml) ja sakka sentrifugoitiin (4000 min^{-1} , 10 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin metanoliin. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Tuotteen **12** saanto oli 2,1 mg (43 %). Reaktio toistettiin 7,1 mg:lla lähtöainetta **10**, jolloin saannoksi saatiin 3,5 mg (50 %).

Tuotteet yhdistettiin samaan keittopulloon ja suoritettiin heksaanipesu. Yhdistetyn tuotteen massa heksaanipesun jälkeen oli 3,4 mg (46,3 %). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 4,40$ (1H, m, H6); 4,07 (1H, m, H13); 3,33–3,16 (6H, m, H3, H10 ja H16); 2,00 (2H, m, H14); 1,75 (4H, m, H7 ja H15); 1,62 (4H, m, H2 ja H9); 1,49 (2H, m, H8); 0,66 (2H, m, H1). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR:ssä ja $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR:ssä ei näkynyt muuta kuin TMS ja liuotinpiikki.

Tuote saostettiin jäädytetystä dietyylieetteristä (12 ml) ja sentrifugoitiin (4000 min^{-1} , 10 min). Supernatantti pipetoitiin talteen ja sakka liuotettiin metanoliin. Liuotin haihdutettiin pois alipaineessa. Saanto oli 0,8 mg (23,5 %). ^1H NMR ei viitannut oikeaan tuotteeseen.

3.3 Oligonukleotidit

3.3.1 Oligonukleotidi **ON7**

Tutkimusryhmässä aiemmin syntetisoitu ja BCN-konjugoitu oligonukleotidi **ON7** puhdistettiin HPLC:llä ajogradientilla 0–25 min 10–70 % MeCN, 25–26 min 70–100 % MeCN, 26–30 min 100 % MeCN, 30–35 min 100–10 % MeCN ja 35–40 min 10 % MeCN. **ON7** määrä oli 0,48 μmol . **ON7**:n ja **ON5**:n muodostaman dupleksin sulamislämpötilaksi määritettiin $49,0^\circ\text{C}$. ESI-MS: m/z 1966,78 $[\text{2M-3H}]^3$ - (havaittu), m/z 1966,76 $[\text{2M-3H}]^3$ - (laskettu), m/z 1474,82 $[\text{M-2H}]^2$ - (havaittu), m/z 1474,82 $[\text{M-2H}]^2$ - (laskettu), m/z 982,87 $[\text{M-3H}]^3$ - (havaittu), m/z 982,88 $[\text{M-3H}]^3$ - (laskettu), m/z 736,89 $[\text{M-4H}]^4$ - (havaittu), m/z 736,91 $[\text{M-4H}]^4$ - (laskettu). Massaspektrissä havaittiin epäpuhtausmassa (5982,29 Da), josta ei päästy puhdistuksella eroon. Epäpuhtauden määrä oli kuitenkin hyvin pieni.

3.3.2 Oligonukleotidin **ON8** synteesi

Oligonukleotidi **ON8** syntetisoitiin automatisoidulla kiinteän kantajan oligosynteesillä ÄKTA OligoPilot plus syntetisaattorilla 3 μmol :n skaalalla. Kiinteä kantaja (2'-OMe-Ac-C-RNA-CPG) (3 μmol) kuivattiin yön yli eksikkaattorissa. Synteesissä käytettiin kaupallisia 2'-OMe -modifioituja fosforamidititeja: A-2'-OMe (135 μmol), C-2'-OMe (270 μmol), G-2'-OMe (135 μmol), U-2'-OMe (225 μmol) ja aminoserinoli (90 μmol). Fosforamiditit punnittiin ja kuivattiin eksikkaattorissa yön yli, jonka jälkeen ne liuotettiin kuivaan asetonitriiliin synteesiä varten. Suojaryhmien poistaminen ja kantajalta irrottaminen suoritettiin 1:1 (v/v) -seoksella ammoniakkin vesiliuosta (25 %, w/w) ja metyyliamiinin vesiliuosta (40 %, w/w) 2 h huoneenlämmössä. Kiinteä kantaja sentrifugoitiin mikrosentrifugiputken pohjalle ja päällä

oleva nestefaasi, jossa valmis oligonukleotidi oli, pipetoitiin talteen. Liuottimet haihdutettiin nestefaasista alipaineessa. Haihdutusjäännös liuotettiin MilliQ-veteen ja suodatettiin PTFE 0,22 µm -ruiskusuodattimella. Liuos kylmäkuivattiin. Oligonukleotidi liuotettiin MilliQ-veteen ja puhdistettiin HPLC:llä ajogradientilla 0–25 min 10–25 % MeCN, 25–26 min 25–100 % MeCN, 26–30 min 100 % MeCN, 30–35 min 100–10 % MeCN ja 35–40 min 10 % MeCN. Fraktiot kylmäkuivattiin ja tuotefraktiot määritettiin massaspektrometrisesti. Tuotefraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin. Tuotteen **ON8** saanto oli 0,77 µmol (26 %). ESI-MS: m/z 2379,43 [M-2H]²⁻(havaittu), m/z 2379,43 [M-2H]²⁻(laskettu), m/z 1585,94 [M-3H]³⁻(havaittu), m/z 1585,95 [M-3H]³⁻(laskettu), m/z 1189,20 [M-4H]⁴⁻(havaittu), m/z 1189,21 [M-4H]⁴⁻(laskettu), m/z 951,15 [M-5H]⁵⁻(havaittu), m/z 951,17 [M-5H]⁵⁻(laskettu), m/z 792,46 [M-6H]⁶⁻(havaittu), m/z 792,47 [M-6H]⁶⁻(laskettu), m/z 679,11 [M-7H]⁷⁻(havaittu), m/z 679,12 [M-7H]⁷⁻(laskettu), m/z 594,10 [M-8H]⁸⁻(havaittu), m/z 594,10 [M-8H]⁸⁻(laskettu).

3.3.3 Oligonukleotidin **ON9** synteesi

Mikrosentrifuugiputkessa olevan kuivan oligonukleotidin **ON8** (3,78 µmol) päälle lisättiin BCN-NHS -esteriä (56,8 µmol), joka oli liuotettuna DMSO:iin (28,4 µl), sekä DIPEA:a (56,8 µmol). Liuokseen muodostui sakkaa, joten joukkoon lisättiin vielä 185 µl DMSO:ia. Reaktiota lämmitettiin 40 asteisessa uunissa 24 h. Toisessa reaktiossa mikrosentrifuugiputkessa olevan kuivan oligonukleotidin **ON8** (3,78 µmol) päälle lisättiin BCN-NHS -esteriä (37,8 µmol), joka oli liuotettuna DMSO:iin (18,9 µl), sekä DIPEA:a (37,8 µmol). Liuokseen muodostui sakkaa, joten joukkoon lisättiin vielä 240 µl DMSO:ia. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 28 h ajan. Reaktioiden etenemistä seurattiin HPLC:llä ajogradientilla 0–25 min 5–50 % MeCN, 25–26 min 50–100 % MeCN, 26–30 min 100 % MeCN, 30–35 min 100–5 % MeCN ja 35–40 min 5 % MeCN. Tuotteet puhdistettiin HPLC:llä samalla ajogradientilla kuin edellä. Kummankin reaktion tuotefraktiot määritettiin massaspektrometrisesti, jonka perusteella molempien reaktioiden tuotefraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin. Tuotteen **ON9** saanto oli yhteensä 0,34 µmol (45 %). **ON9**:n ja **ON5**:n muodostaman dupleksin sulamislämpötilaksi määritettiin 54,4°C. ESI-MS: m/z 2467,46 [M-2H]²⁻(havaittu), m/z 2467,47 [M-2H]²⁻(laskettu), m/z 1644,62 [M-3H]³⁻(havaittu), m/z 1644,64 [M-3H]³⁻(laskettu), m/z 1233,22 [M-4H]⁴⁻(havaittu), m/z 1233,23 [M-4H]⁴⁻(laskettu), m/z 986,37 [M-5H]⁵⁻(havaittu), m/z 986,38 [M-5H]⁵⁻(laskettu), m/z 821,80 [M-6H]⁶⁻(havaittu), m/z 821,82 [M-6H]⁶⁻(laskettu), m/z 704,26 [M-

$7\text{H}]^{7-}$ (havaittu), m/z 704,27 $[\text{M}-7\text{H}]^{7-}$ (laskettu), m/z 616,11 $[\text{M}-8]^{8-}$ (havaittu), m/z 616,11 $[\text{M}-8\text{H}]^{8-}$ (laskettu), m/z 547,54 $[\text{M}-9\text{H}]^{9-}$ (havaittu), m/z 547,54 $[\text{M}-9\text{H}]^{9-}$ (laskettu).

3.4 Pallonukleiinihapot

3.4.1 Yhdisteen **13** synteesi

Yhdisteen **11** vesiliuokseen (4,2 μl , 12,5 nmol) lisättiin **ON7**:n vesiliuosta (150 μl , 150 nmol). Liuokseen lisättiin vielä 30 μl 4,5 M NaCl:in vesiliuosta. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 72 h ajan. Reaktion etenemistä tarkasteltiin PAGE:lla. Reaktioliuokseen lisättiin atsidoetoksietoksietanolia (1500 nmol) liuotettuna DMSO:iin (15,2 μl) ja annettiin reagoida 24 h. Tuote puhdistettiin HPLC:llä ajogradientilla 0–25 min 10–35 % MeCN, 25–26 min 35–100 % MeCN, 26–30 min 100 % MeCN, 30–35 min 100–10 % MeCN ja 35–40 min 10 % MeCN. Tuotefraktio kylmäkuivattiin ja liuotettiin nukleasivapaaseen veteen. Tuotteen **13** saanto oli 6,0 nmol (48 %). Tuotteen puhtaus varmistettiin vielä PAGE:lla sekä tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti. Massaspekttrissä oli havaittavissa **ON7**:n massaspekttrissä esiin tullut epäpuhtausmassa (5982,29 Da). Tuotteen **13** ja **ON5**:n muodostaman sekundäärirakenteen sulamislämpötilaksi määritettiin 52,9°C.

3.4.2 Yhdisteen **14** synteesi

Yhdisteen **11** vesiliuokseen (2 μl , 6 nmol) lisättiin **ON9**:n vesiliuosta (72 μl , 72 nmol). Liuokseen lisättiin vielä 36,6 μl 4,5 M NaCl:in vesiliuosta. Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä 144 h ajan. Tuote puhdistettiin HPLC:llä ajogradientilla 0–25 min 10–25 % MeCN, 25–26 min 25–100 % MeCN, 26–30 min 100 % MeCN, 30–35 min 100–10 % MeCN ja 35–40 min 10 % MeCN. Tuotepiikki fraktioitiin neljään eri fraktioon. Fraktioita tarkasteltiin PAGE:lla, jonka perusteella fraktiot 3 ja 4 sisälsivät eniten haluttua tuotetta **14**. Geelin perusteella kvantitoitiin kahdeksasti, seitsemästi ja kuudesti substituoitujen tuotteiden suhteelliset määrät prosenttiosuuksina, jotka olivat fraktiossa 3 seuraavanlaiset: 8-substituoitu 60 %, 7-substituoitu 32 % ja 6-substituoitu 8 %. Fraktiossa 4 puolestaan prosenttiosuudet jakautuivat seuraavasti: 8-substituoitu 62 %, 7-substituoitu 29 % ja 6-substituoitu 9 %. Fraktiot 3 ja 4 kylmäkuivattiin ja liuotettiin nukleasivapaaseen veteen. Tuotefraktioiden saantojen määrittämiseen käytettiin kahdeksasti, seitsemästi ja kuudesti substituoitujen tuotteiden absorptiokertoimien suhteellista keskiarvoa. Fraktion 3 absorptiokerroin oli näin ollen 935 488 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ja fraktion 4 absorptiokerroin oli 936 732 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Fraktion 3 saanto oli 0,8

nmol ja fraktion 4 saanto oli 0,6 nmol (yhteensä 1,4 nmol, 24 %). Tuote onnistuttiin karakterisoimaan massaspektrometrisesti, mutta se ionisoitui todella huonosti. Tuotteen **14** ja **ON5**:n muodostaman sekundäärirakenteen sulamislämpötilaksi määritettiin 56,5 °C.

3.5 Kinetiikkakokeet

3.5.1 Heksameerien kinetiikkakokeet

50 µl HEPES-puskuria ($c = 0,40$ M, $I = 0,40$ M, $\text{pH} = 7,5$), 50 µl sisäistä standardia 4-nitrobentseenisulfonihappoa (1,0 mM), 50 µl kohde-RNA:ta (200 µM) ja 50 µl katalyyttiä (100 µM) lisättiin mikrosentrifuugiputkeen. Reaktioiden aloitustilavuus oli näin ollen 200 µl ($c(\text{HEPES}) = 0,10$ M, $I(\text{HEPES}) = 0,10$ M, $c(4\text{-nitrobentseenisulfonihappo}) = 0,25$ mM, $c(\text{kohde-RNA}) = 50$ µM, $c(\text{katalyytti}) = 25$ µM). Reaktiot suoritettiin 35 °C asteessa ja reaktioiden pH oli 7,5. Reaktioliuoksista otettiin sopivin aikavälein 20 µl näytteet, jotka laitettiin heti jäävesihauteeseen. Reaktio pysäytettiin näytteissä lisäämällä 3 µl 1 M HCl-vesiliuosta. Näytteet analysoitiin mahdollisimman pian RP-HPLC:llä käyttäen analyyttistä Thermo Scientific ODS Hypersil (250 × 4,6 mm, 5 µm) -kolonnia. Ajoliuoksina käytettiin 50 mM TEAA-liuoksia ($\text{pH} = 7$) MilliQ-vedessä sekä asetonitriilissä. Ajogradienttina käytettiin 0–20 min 3–10 % MeCN, 20–30 min 10–100 % MeCN. Kromatogrammien piikit integroitiin ja heksameereille saadut arvot korjattiin jakamalla ne standardille saatujen integraalien arvoilla. Data normalisoitiin aloituspisteen suhteen. Ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot määritettiin kohde-RNA:n määrän vähenemiselle.

3.5.2 HER2-sekvenssin kinetiikkakokeet

10 µl HEPES-puskuria ($c = 0,40$ M, $I = 0,40$ M, $\text{pH} = 7,5$), 5 µl sisäistä standardia **ON6** (200 µM), 5 µl nukleasivapaata vettä, 10 µl kohde-RNA:ta (200 µM) ja 10 µl katalyyttiä (100 µM) lisättiin mikrosentrifuugiputkeen. Reaktioiden aloitustilavuus oli näin ollen 40 µl ($c(\text{HEPES}) = 0,10$ M, $I(\text{HEPES}) = 0,10$ M, $c(\text{ON6}) = 0,25$ mM, $c(\text{kohde-RNA}) = 50$ µM, $c(\text{katalyytti}) = 25$ µM). Reaktiot suoritettiin 35 °C asteessa ja reaktioiden pH oli 7,5. Reaktioliuoksista otettiin sopivin aikavälein 4 µl näytteet, joihin lisättiin 6 µl nukleasivapaata vettä. Reaktio pysäytettiin näytteissä lisäämällä 1 µl 1 M HCl-liuosta. Reaktionäytteet jäädytettiin nestetyypellä ja säilytettiin pakkasessa PAGE-analyysiin saakka. Näytteet laimennettiin kymmenkertaisiksi. 5 µl laimennoksen joukkoon lisättiin 5 µl Novex TBE-Urea 2× -näytepuskuria, ja geelille pipetoitiin 10 µl. Näytteet analysoitiin denaturoivalla PAGE:lla käyttäen kaupallisia 15 %

Novex TBE-Urea geelejä (15 % akryyliamidi, TBE, 7 M urea). Ajopuskurina käytettiin 1×TBE (90 mM Tris, 90 mM boraatti, 2 mM EDTA, pH 8,3) -puskuria. Ajoaika oli 45 minuuttia ja käytetty jännite 200 V sekä sähkövirta 45 mA. Geelit kuvattiin kohde-RNA:n ja standardin **ON6** fluoresenssileimojen perusteella Bio Rad ChemiDocTM MP-laitteella. Kuvat muutettiin 2D-tiheysprofiileiksi, jotka integroitiin käyttäen ImageJ-ohjelmaa. **ON5**:lle saadut arvot korjattiin jakamalla ne standardille saatujen integraalien arvoilla. Data normalisoitiin aloituspisteen suhteen. Ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot määritettiin kohde-RNA:n määrän vähenemiselle.

4 Johtopäätökset ja yhteenveto

Keinotekoiset ribonukleasit ovat herättäneet tutkimuksissa paljon mielenkiintoa potentiaalisena sekvenssispesifisenä menetelmänä epänormaalista geenien säätelystä johtuvien sairauksien hoitoon. Lineaaristen oligonukleotidien terapeuttisessa käytössä on kuitenkin vielä omat haasteensa etenkin niiden soluun kulkeutumisen kanssa. Keinotekoisien ribonukleasien muodostaminen pallonukleiinihapoksi, voisi olla potentiaalinen ratkaisu, jolla saataisiin parannettua niiden soluun kulkeutumista. Lisäksi tällaisten rakenteiden polyvalenttisuuden ansiosta niillä on hyvät mahdollisuudet optimaalisen paikalliskonsentraation saavuttamisen katalyytin ja kohde-RNA:n välille, mikä johtaisi tehostuneeseen pilkkoutumiseen.

COSS-lysiini-arginiini -katalyytti **11** syntetisoitiin onnistuneesti. Synteesissä ja puhdistuksissa käytetyt menetelmät todettiin toimiviksi. Suojaryhmästrategioista Boc-Arg (Boc)₂-OH toimi paremmin katalyytin synteesissä. COSS-lysiini-arginiini -yhdiste osoittautui tehokkaaksi organokatalyytiksi, sillä HER2-geenin hydrolysoitumisen puoliintumisaika kyseisellä katalyytillä oli 10 h ± 0,52 h. Katalyytistä muodostettujen mahdollisten metallikoordinaatiokompleksien (Zn²⁺, Cu²⁺ ja Pd²⁺) reaktiot olivat huomattavasti hitaampia, kuin pelkällä organokatalyytillä. Zn²⁺-ionin kanssa HER2-geenin hydrolysoitumisen puoliintumisaika oli 278 h ± 28 h ja Cu²⁺-ionin kanssa 465 h ± 73 h. Pd²⁺-ionin kanssa ei tapahtunut lainkaan hydrolysoitumista HER2-geenin hydrolyysireaktiossa ja heksameerien hydrolysoitumisten puoliintumisaikoja ei onnistuttu kyseisissä reaktioissa määrittämään, sillä reaktionäytteet sakkaantuivat.

Katalyytistä muodostetut pallonukleiinihapot **13** ja **14** syntetisoitiin onnistuneesti SPAAC-menetelmällä. Pallonukleiinihappojen monofunktionalisointituotteita ei onnistuttu todentamaan HPLC:llä eikä PAGE:lla, minkä vuoksi synteseissä siirryttiin suoraan täysfunktionalisointiin. Ensimmäisen pallonukleiinihapon **13** täysfunktionalisointi meni täysin loppuun asti ja se saatiin hyvin puhdistettua HPLC:llä. Toisen pallonukleiinihapon **14** kohdalla havaittiin pitkän reaktioajan jälkeen vielä useita vajaasti substituoituja tuotteita täysfunktionalisoidun tuotteen rinnalla. Tämä vaikeutti täysfunktionalisoidun tuotteen puhdistamista HPLC:llä. PAGE:lla tuotteet erottuivat paremmin, minkä vuoksi se voisi olla potentiaalinen vaihtoehto täysfunktionalisoidun tuotteen puhdistamiseksi.

Komplementaaristen oligonukleotidijuosteiden liittäminen katalyyttiin hidasti HER2-geenin hydrolysoitumista toisin kuin hypoteesina oli. Pallonukleiinihapon **13** katalysoiman HER2-

geenin hydrolysoitumisen puoliintumisaika oli $71 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ ja pallonukleiinihapon **14** katalysoimassa reaktiossa puoliintumisaika oli $43 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$. Tämän vuoksi selvitettiin, mistä kohdista HER2-geeni hajoaa katalyytin vaikutuksesta. Tuloksista havaittiin selkeästi yksi pääasiallinen hajoamiskohta, joka sijaitti HER2-geenin ja pallonukleiinihappojen oligonukleotidijuosteiden komplementaarisella alueella, johon kaksoisjuoste muodostuu. Yksijuosteisten alueiden on todettu hajoavan nopeammin kohde-RNA:ssa, mikä on yksi syy siihen, miksi HER2-geenin hydrolyysireaktiot olivat hitaampia muodostettujen pallonukleiinihappojen kanssa kuin pelkällä katalyytillä.

Pallonukleiinihapon **13** ja HER2-geenin välisen kaksoisjuosteen muodostuessa HER2-geenissä vapaaksi jääneen 3'-pään tuominen lähelle katalyyttiä ei myöskään nopeuttanut reaktiota, sillä hajoaminen tapahtuu pääasiassa juuri toisessa päässä HER2-geeniä. Pallonukleiinihapon **14** katalysoima HER2-geenin hydrolysoituminen oli nopeampi kuin pallonukleiinihapon **13** katalysoima. Tämä voisi johtua siitä, että yhdisteen **14** kohdalla myös HER2-geenin 3'-pää on hybridisoitunut muodostuneeseen sekundäärirakenteeseen, jolloin se ei ole mahdollisesti häiritsemässä katalyytin pääsyä pääasialliseen hajoamiskohtaan. Lisäksi pallonukleiinihapon **14** tapauksessa 8-substitoitua ei onnistuttu erottamaan 7- ja 6-substituoiduista tuotteista, minkä vuoksi vajaissa substituointituotteissa vapaaksi jääneet haarat ovat voineet pilkkoa vapaana olevia HER2-geenejä tehokkaammin sen pääasiallisesta katkaisukohtasta. Pallonukleiinihapon **14** katalysoima HER2-geenin hydrolysoituminen oli kuitenkin huomattavasti hitaampi kuin pelkällä katalyytillä, joten toivottua jännitteen tehostamaa katkeamista ei tapahtunut.

Työn tulosten perusteella polyoktavalentti arginiinilysiini-silsekvioksaanikuutio osoittautui potentiaalisesti keskusrakenteeksi organonanotsyymeihin. Ohjaavien oligonukleotidien sekvenssiä sekä kemiaa muuttamalla on mahdollista vaikuttaa organonanotsyymien tehokkuuteen ja spesifisyyteen pilkkoa kohde-RNA:ta. Tässä tutkimuksessa muodostetut pallonukleiinihapot eivät osoittautuneet kovinkaan tehokkaiksi katalyyteiksi HER2-geenin pilkkomisessa, minkä vuoksi jatkotutkimuksen kohteena voisi olla oligonukleotidijuosteiden optimointi paremmiksi katalyysin kannalta, kun tiedetään mistä kohdista HER2-geeni pilkkoutuu.

Lähteet

1. Staroseletz, Y. *et al.* 'Dual' peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA. *Biomaterials* **112**, 44–61 (2017).
2. Kumar, P. & Brown, T. The role of chemistry in the success of oligonucleotides as therapeutics. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **18**, 197–199 (2022).
3. Staroseletz, Y. *et al.* Strict conformational demands of RNA cleavage in bulge-loops created by peptidyl-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res* **48**, 10662–10679 (2020).
4. Staroseletz, Y. *et al.* Site-selective artificial ribonucleases: Renaissance of oligonucleotide conjugates for irreversible cleavage of rna sequences. *Molecules* **26**, (2021).
5. Kulkarni, J. A. *et al.* The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol* **16**, 630–643 (2021).
6. Yusuf, A., Almotairy, A. R. Z., Henidi, H., Alshehri, O. Y. & Aldughaim, M. S. Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems. *Polymers (Basel)* **15**, (2023).
7. Cutler, J. I., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. Spherical nucleic acids. *J Am Chem Soc* **134**, 1376–1391 (2012).
8. Moasser, M. M. The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469–6487 (2007).
9. Niittymäki, T. & Lönnberg, H. Artificial ribonucleases. *Org Biomol Chem* **4**, 15–25 (2006).
10. Forconi, M. & Herschlag, D. Metal ion-based RNA cleavage as a structural probe. *Methods Enzymol* **468**, 91–106 (2009).
11. Morrow, J. R., Buttrey, L. A., Shelton, V. M. & Berback, K. A. Efficient Catalytic Cleavage of RNA by Lanthanide(III) Macrocyclic Complexes: Toward Synthetic Nucleases for in Vivo Applications. *Anal. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **114**, 1665–1673 (1992).
12. Niittymäki, T. ARTIFICIAL RIBONUCLEASES: OLIGONUCLEOTIDES CONJUGATED WITH METAL ION CHELATES OF AZACROWNS.
13. Diez-Castellnou, M., Martinez, A. & Mancin, F. Phosphate Ester Hydrolysis: The Path From Mechanistic Investigation to the Realization of Artificial Enzymes. in *Advances in Physical Organic Chemistry* vol. 51 129–186 (Academic Press Inc., 2017).
14. Williams, N. H., Takasaki, B., Wall, M. & Chin, J. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Acc Chem Res* **32**, 485–493 (1999).
15. Williams, A. *et al.* Peptidyl-Oligonucleotide Conjugates Demonstrate Efficient Cleavage of RNA in a Sequence-Specific Manner. *Bioconjug Chem* **26**, 1129–1143 (2015).
16. Gnaccarini, C. *et al.* Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides. *J Am Chem Soc* **128**, 8063–8067 (2006).

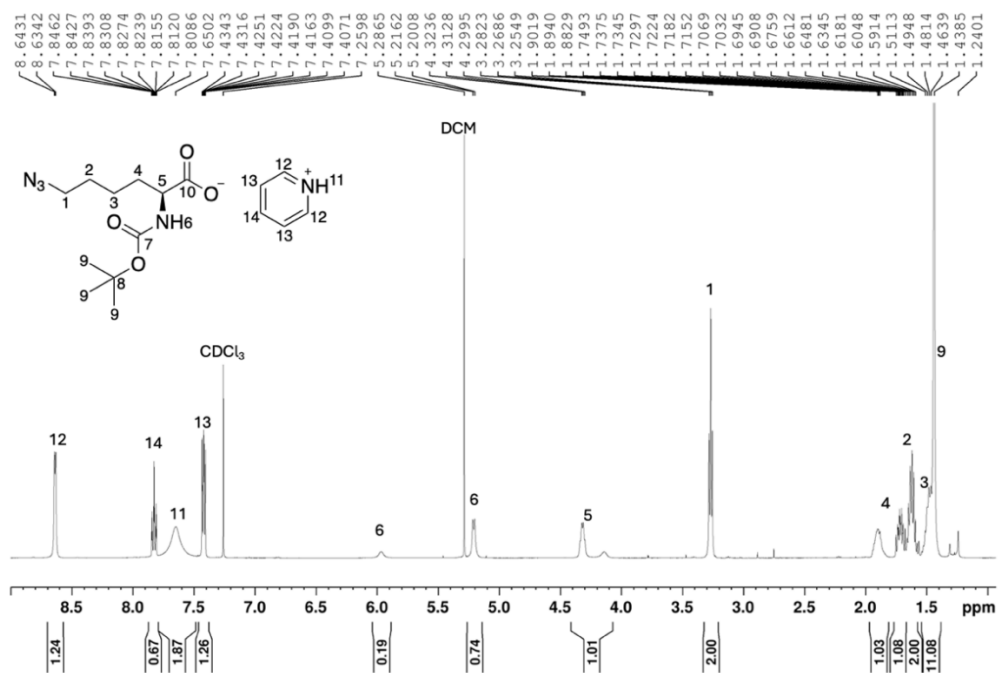
17. Scheffer, U. *et al.* Metal-free catalysts for the hydrolysis of RNA derived from guanidines, 2-aminopyridines, and 2-aminobenzimidazoles. *J Am Chem Soc* **127**, 2211–2217 (2005).
18. Danneberg, F. *et al.* RNA Hydrolysis by Heterocyclic Amidines and Guanidines: Parameters Affecting Reactivity. *European J Org Chem* **2021**, 6358–6366 (2021).
19. Perreault, D. M., Cabell, L. A. & Anslyn, E. V. Using Guanidinium Groups for the Recognition of RNA and as Catalysts for the Hydrolysis of RNA. *Bioorg Med Chem* **5**, 1209–1220 (1997).
20. Åström, H. & Strömberg, R. Synthesis of new OBAN's and further studies on positioning of the catalytic group. *Org Biomol Chem* **2**, 1901–1907 (2004).
21. Kaukinen, U., Bielecki, L., Mikkola, S., Adamiak, R. W. & Lönnberg, H. The cleavage of phosphodiester bonds within small RNA bulges in the presence and absence of metal ion catalysts. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1024–1031 (2001) doi:10.1039/b102519h.
22. Hüsken, D. *et al.* Creating RNA Bulges: Cleavage of RNA in RNA/DNA Duplexes by Metal Ion Catalysis †. *Biochemistry* **35**, 16591–16600 (1996).
23. Patutina, O. A. *et al.* Catalytic knockdown of MIR-21 by artificial Ribonuclease: Biological performance in tumor model. *Front Pharmacol* **10**, (2019).
24. Huang, Q., Yu, H. & Ru, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *J Food Sci* **75**, (2010).
25. Bajpai, V. K. *et al.* Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal* **26**, 1201–1214 (2018).
26. Li, H. *et al.* Molecular spherical nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 4340–4344 (2018).
27. Barnaby, S. N. *et al.* Design Considerations for RNA Spherical Nucleic Acids (SNAs). *Bioconjug Chem* **27**, 2124–2131 (2016).
28. Halo, T. L. *et al.* NanoFlares for the detection, isolation, and culture of live tumor cells from human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 17104–17109 (2014).
29. Mokhtarzadeh, A. *et al.* Applications of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles as Delivery Systems. *Trends Mol Med* **25**, 1066–1079 (2019).
30. Raines, R. T. Ribonuclease A. **98**, (1998).
31. Hauptenthal, J., Baehr, C., Kiermayer, S., Zeuzem, S. & Piiper, A. Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochem Pharmacol* **71**, 702–710 (2006).
32. Seferos, D. S., Prigodich, A. E., Giljohann, D. A., Patel, P. C. & Mirkin, C. A. Polyvalent DNA nanoparticle conjugates stabilize nucleic acids. *Nano Lett* **9**, 308–311 (2009).
33. Xiao, F. *et al.* Organic Spherical Nucleic Acids for the Transport of a NIR-II-Emitting Dye Across the Blood–Brain Barrier. *Angewandte Chemie - International Edition* **59**, 9702–9710 (2020).

34. Choi, C. H. J., Hao, L., Narayan, S. P., Auyeung, E. & Mirkin, C. A. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7625–7630 (2013).
35. Patel, P. C. *et al.* Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug Chem* **21**, 2250–2256 (2010).
36. Dowdy, S. F. Endosomal escape of RNA therapeutics: How do we solve this rate-limiting problem? *RNA* **29**, 396–401 (2023).
37. Valatabar, N. *et al.* Recent advances in gene delivery nanoplatforms based on spherical nucleic acids. *J Nanobiotechnology* **22**, (2024).
38. Massich, M. D. *et al.* Regulating immune response using polyvalent nucleic acid-gold nanoparticle conjugates. *Mol Pharm* **6**, 1934–1940 (2009).
39. Hill, H. D., Millstone, J. E., Banholzer, M. J. & Mirkin, C. A. The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano* **3**, 418–424 (2009).
40. Song, Y., Song, W., Lan, X., Cai, W. & Jiang, D. Spherical nucleic acids: Organized nucleotide aggregates as versatile nanomedicine. *Aggregate* **3**, (2022).
41. Wu, X. A., Choi, C. H. J., Zhang, C., Hao, L. & Mirkin, C. A. Intracellular fate of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc* **136**, 7726–7733 (2014).
42. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. & Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, (1996).
43. Lee, J. S., Lytton-Jean, A. K. R., Hurst, S. J. & Mirkin, C. A. Silver nanoparticle - Oligonucleotide conjugates based on DNA with triple cyclic disulfide moieties. *Nano Lett* **7**, 2112–2115 (2007).
44. Mitchell, G. P., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots [10]. *J Am Chem Soc* **121**, 8122–8123 (1999).
45. Young, K. L. *et al.* Hollow spherical nucleic acids for intracellular gene regulation based upon biocompatible silica shells. *Nano Lett* **12**, 3867–3871 (2012).
46. Cutler, J. I., Zheng, D., Xu, X., Giljohann, D. A. & Mirkin, C. A. Polyvalent oligonucleotide iron oxide nanoparticle ‘click’ conjugates. *Nano Lett* **10**, 1477–1480 (2010).
47. Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research* **12**, 2313–2333 (2010).
48. Janaszewska, A., Gradzinska, K., Marcinkowska, M., Klajnert-Maculewicz, B. & Stanczyk, W. A. In vitro studies of polyhedral oligo silsesquioxanes: Evidence for their low cytotoxicity. *Materials* **8**, 6062–6070 (2015).
49. Banga, R. J., Chernyak, N., Narayan, S. P., Nguyen, S. T. & Mirkin, C. A. Liposomal spherical nucleic acids. *J Am Chem Soc* **136**, 9866–9869 (2014).
50. Li, Z., Zhang, Y., Fullhart, P. & Mirkin, C. A. Reversible and chemically programmable micelle assembly with DNA block-copolymer amphiphiles. *Nano Lett* **4**, 1055–1058 (2004).

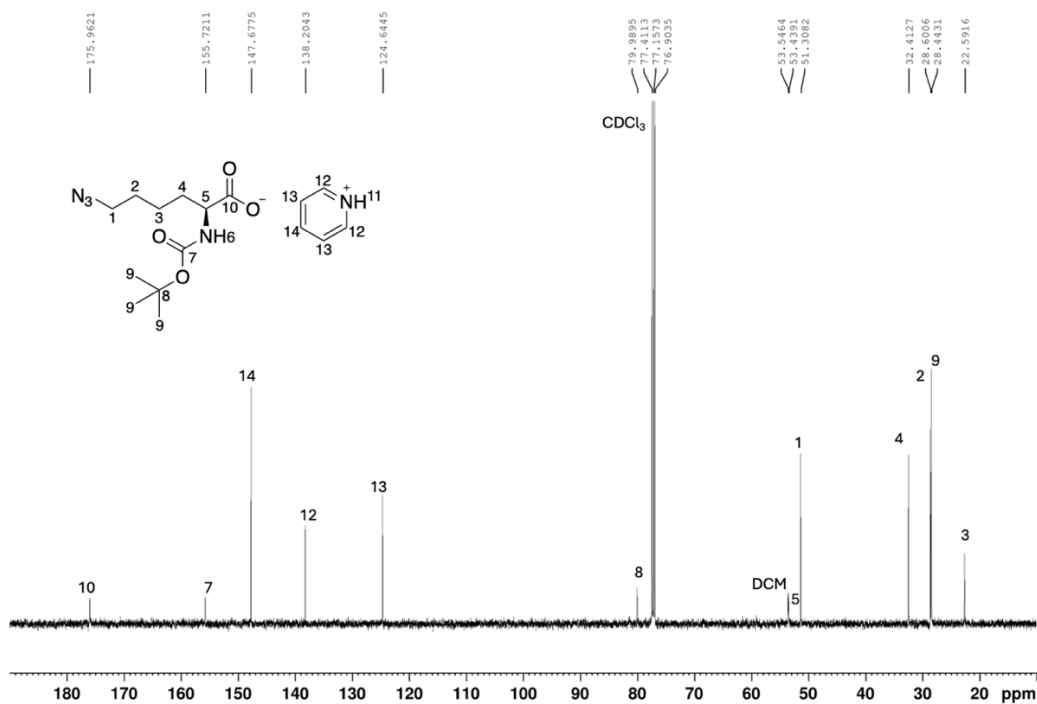
51. Brodin, J. D., Sprangers, A. J., McMillan, J. R. & Mirkin, C. A. DNA-Mediated Cellular Delivery of Functional Enzymes. *J Am Chem Soc* **137**, 14838–14841 (2015).
52. Tan, X. *et al.* Light-triggered, self-immolative nucleic acid-drug nanostructures. *J Am Chem Soc* **137**, 6112–6115 (2015).
53. Tan, X. *et al.* Blurring the Role of Oligonucleotides: Spherical Nucleic Acids as a Drug Delivery Vehicle. *J Am Chem Soc* **138**, 10834–10837 (2016).
54. Farokhzad, O. C. & Langer, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1456–1459 (2006).
55. Baney, R. H., Itoh, M., Sakakibara, A. & Suzuki, T. Silsesquioxanes. *Chem. Rev* **95**, 1409–1430 (1995).
56. John, Ł., Malik, M., Janeta, M. & Szafert, S. First step towards a model system of the drug delivery network based on amide-POSS nanocarriers. *RSC Adv* **7**, 8394–8401 (2017).
57. Loman-Cortes, P., Huq, T. B. & Vivero-Escoto, J. L. Use of polyhedral oligomeric silsesquioxane (Poss) in drug delivery, photodynamic therapy and bioimaging. *Molecules* **26**, (2021).
58. Janeta, M., John, Ł., Ejfler, J. & Szafert, S. High-yield synthesis of amido-functionalized polyoctahedral oligomeric silsesquioxanes by using acyl chlorides. *Chemistry - A European Journal* **20**, 15966–15974 (2014).
59. Erli, H. J. *et al.* Surface pretreatments for medical application of adhesion. *Biomed Eng Online* **2**, (2003).
60. Wang, Q. *et al.* Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **125**, 3192–3193 (2003).
61. Gulumkar, V. *et al.* Controlled Monofunctionalization of Molecular Spherical Nucleic Acids on a Buckminster Fullerene Core. *Bioconjug Chem* **32**, 1130–1138 (2021).
62. Fulmer, G. R. *et al.* NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **29**, 2176–2179 (2010).

Liitteet

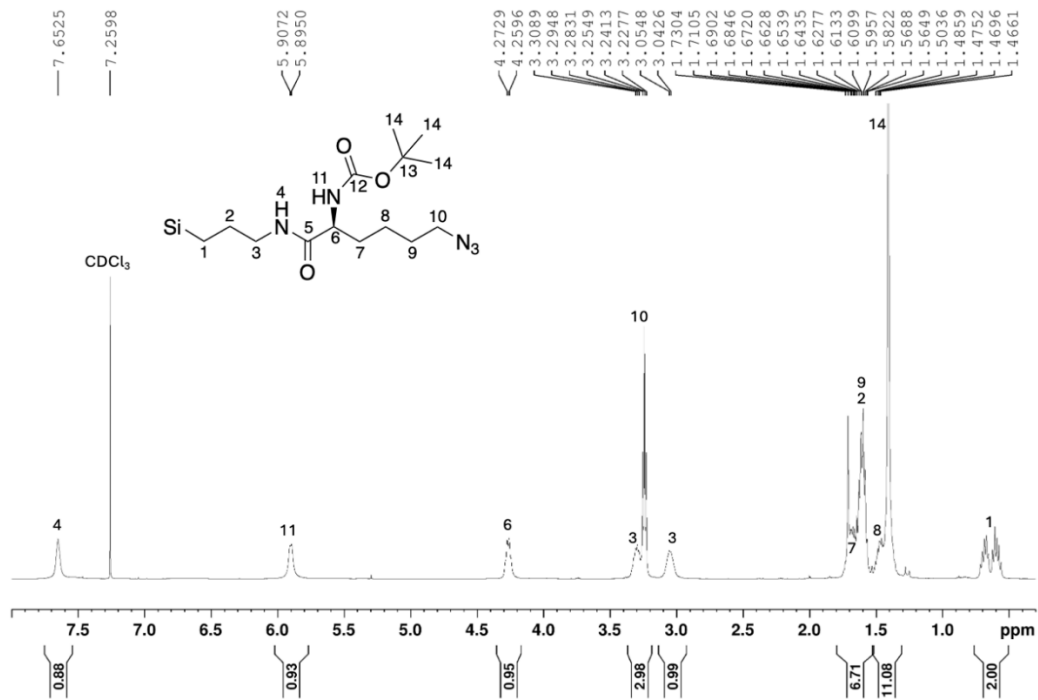
Liite 1. Yhdisteen 2 ^1H NMR-spektri



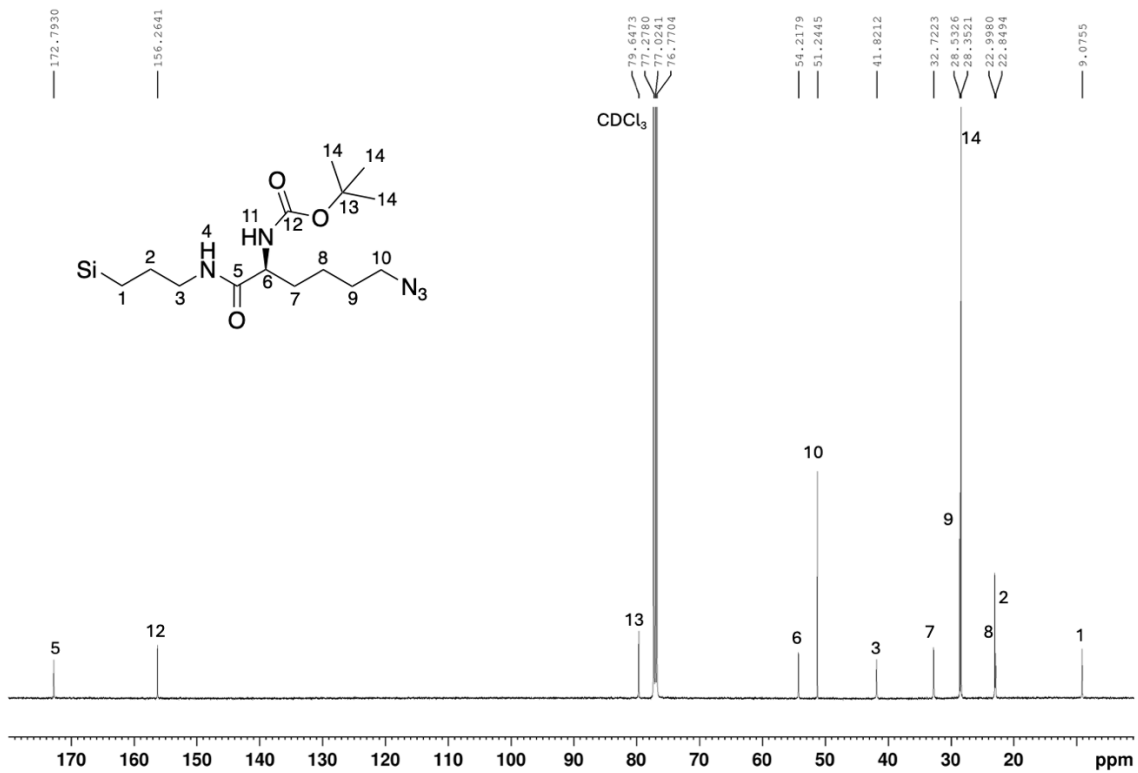
Liite 2. Yhdisteen 2 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



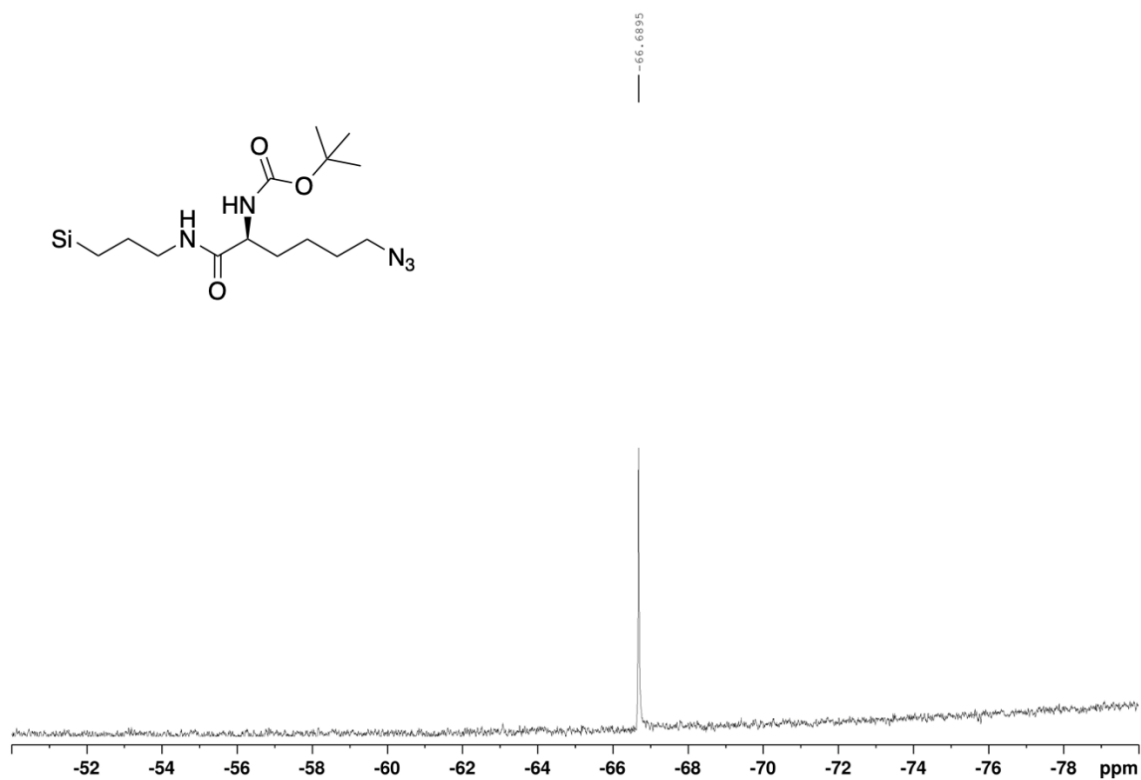
Liite 3. Yhdisteen 5 ^1H NMR-spektri



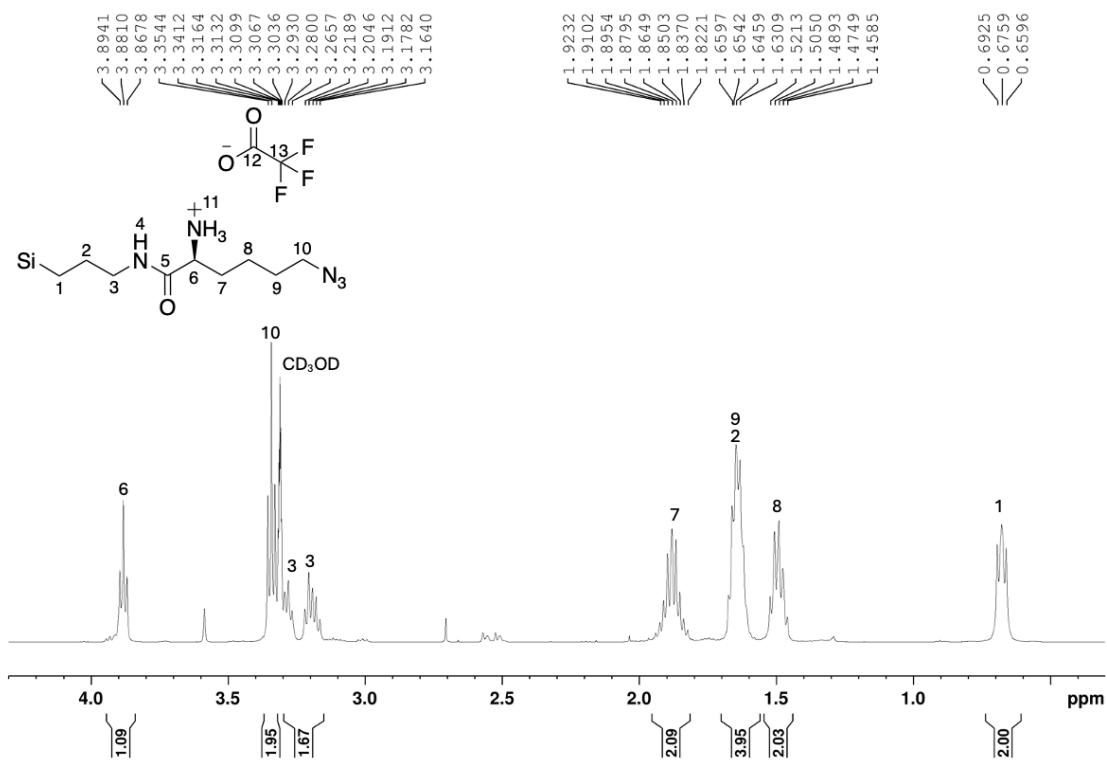
Liite 4. Yhdisteen 5 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



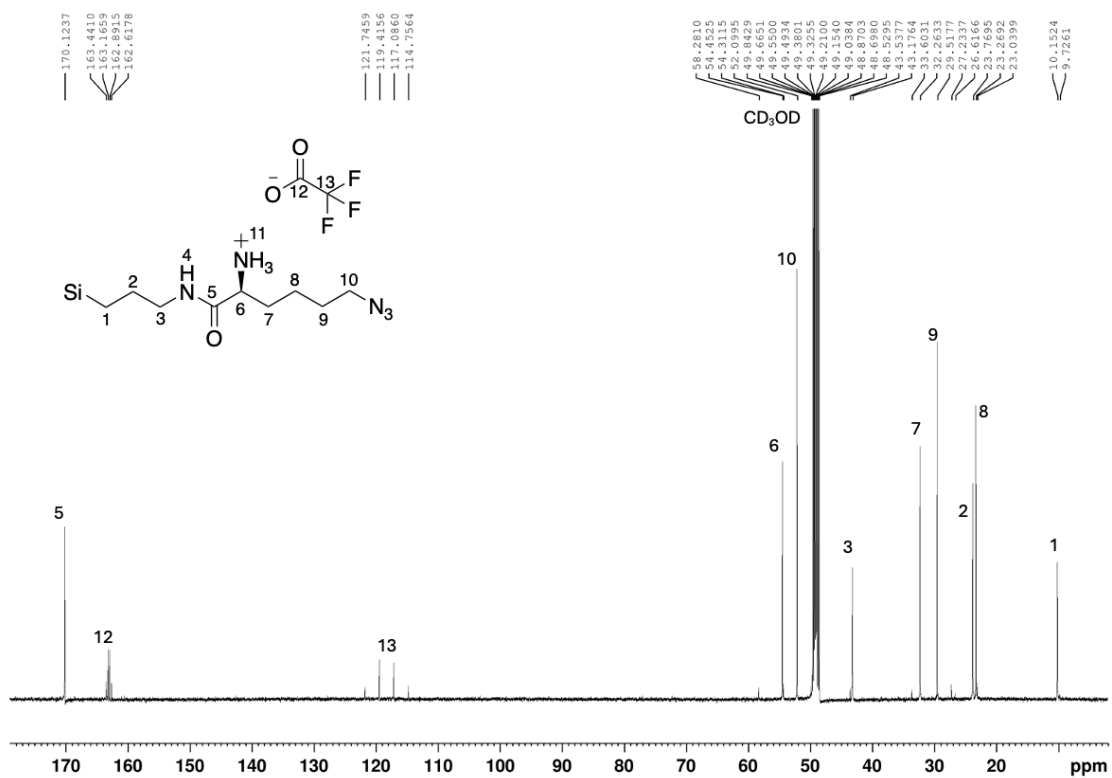
Liite 5. Yhdisteen 5 $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



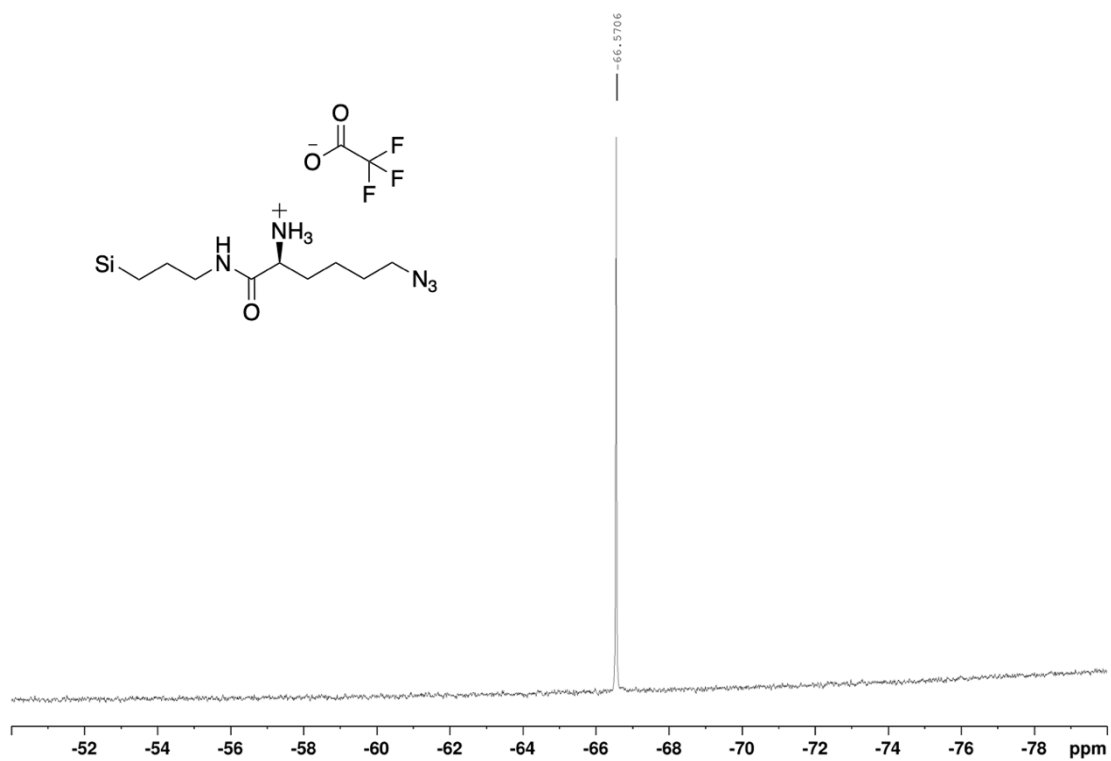
Liite 6. Yhdisteen 6 ^1H NMR-spektri



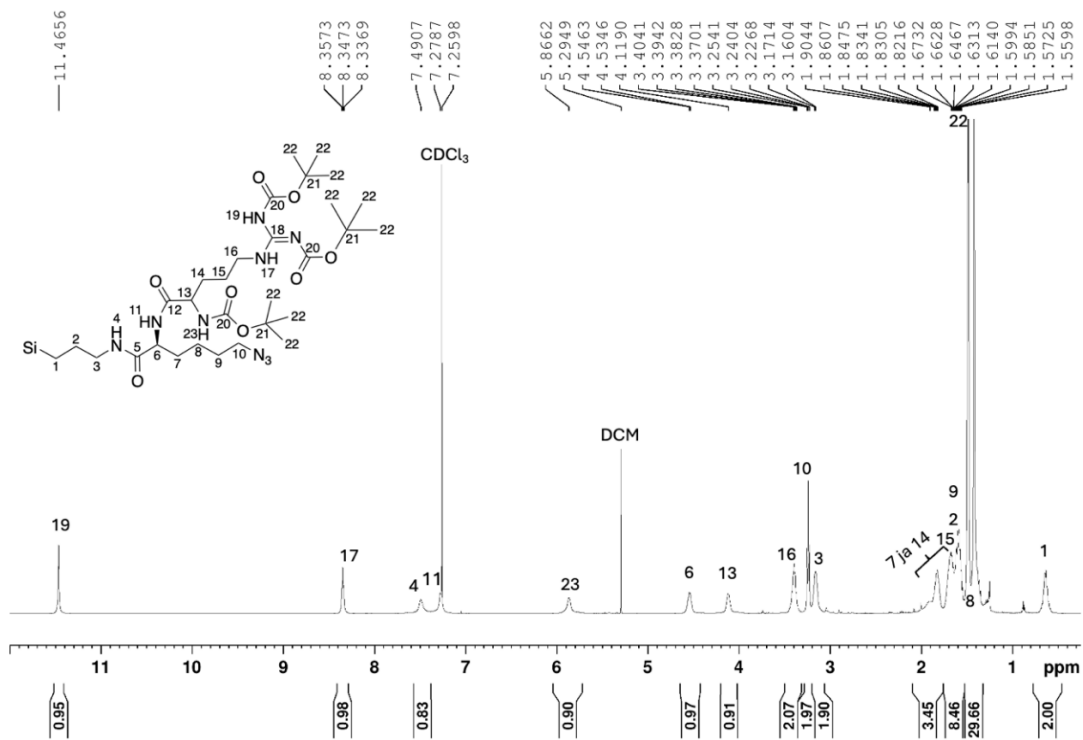
Liite 7. Yhdisteen 6 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



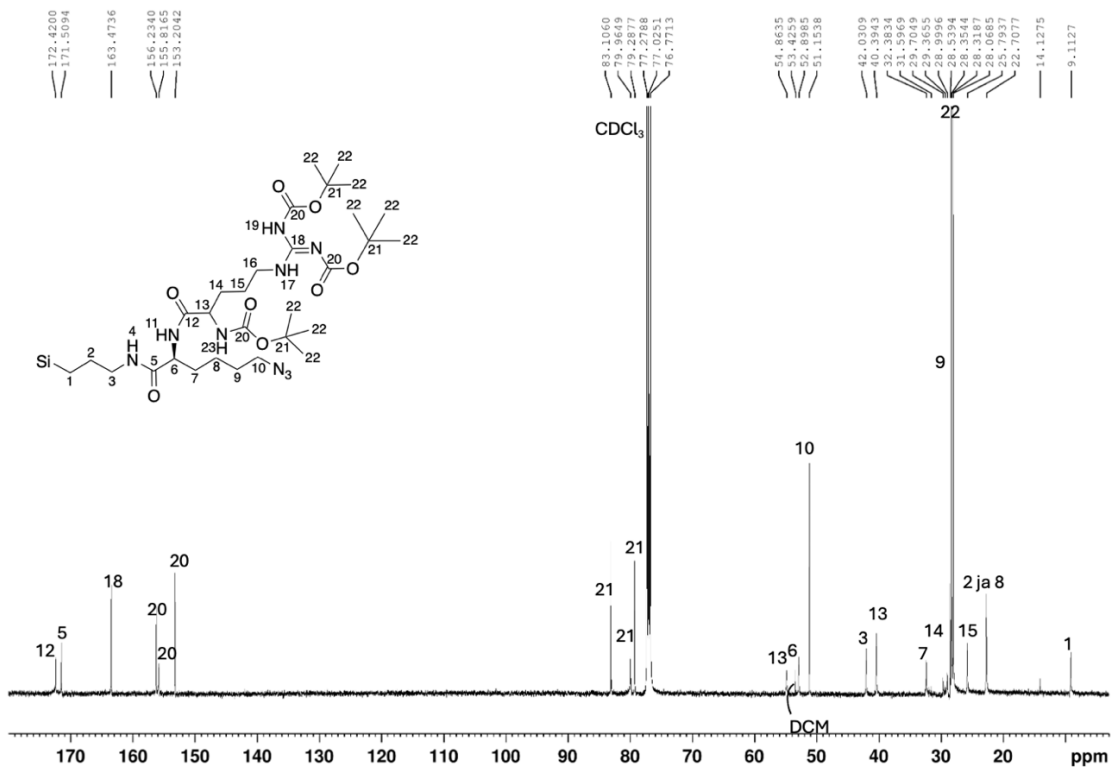
Liite 8. Yhdisteen 6 $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



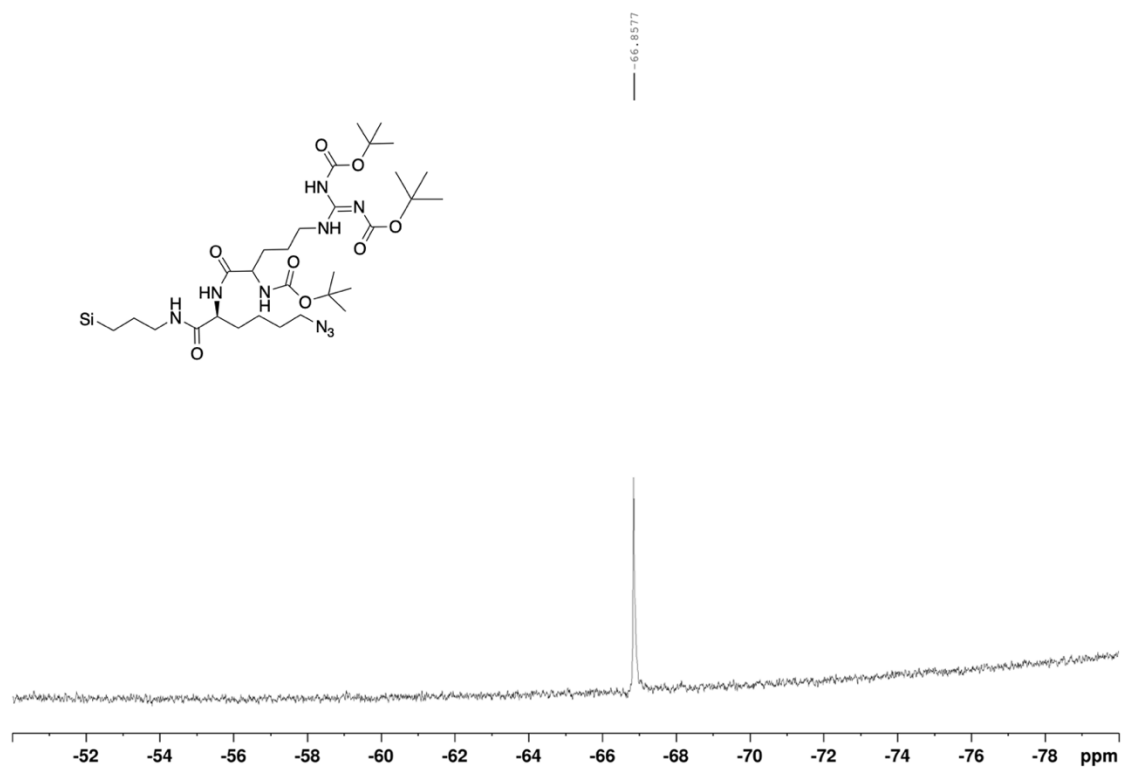
Liite 9. Yhdisteen 8 ^1H NMR-spektri



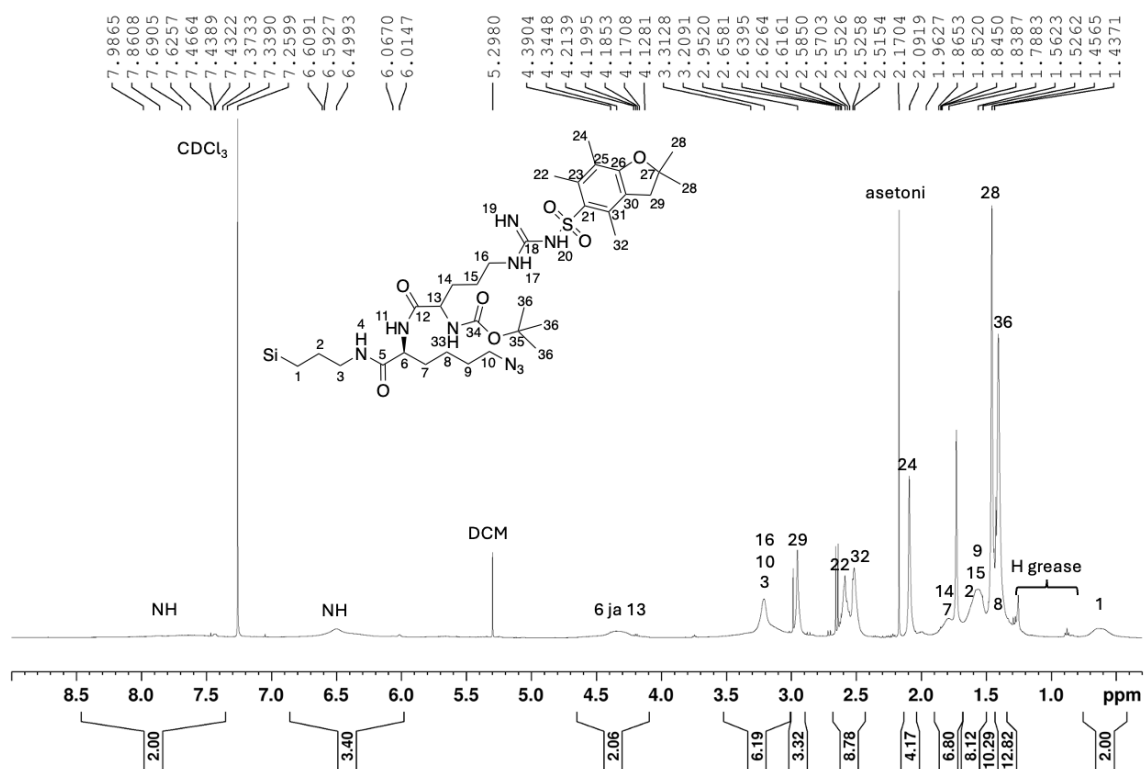
Liite 10. Yhdisteen 8 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



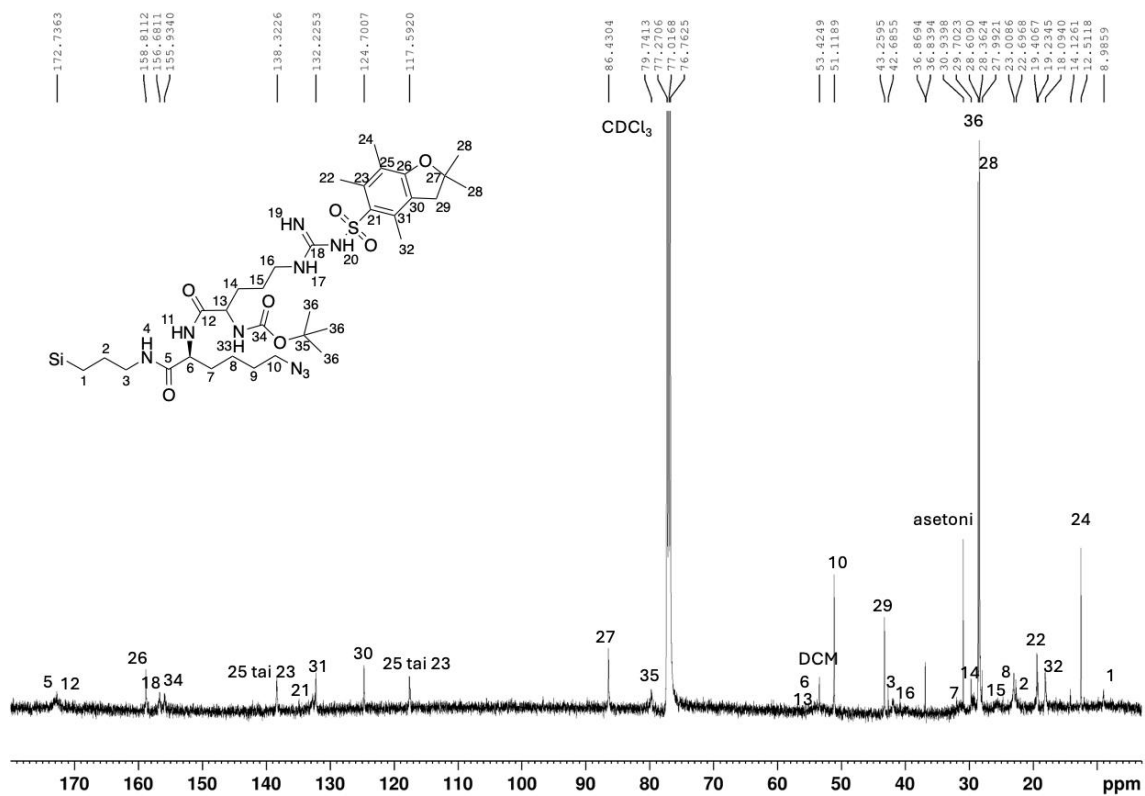
Liite 11. Yhdisteen **8** $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



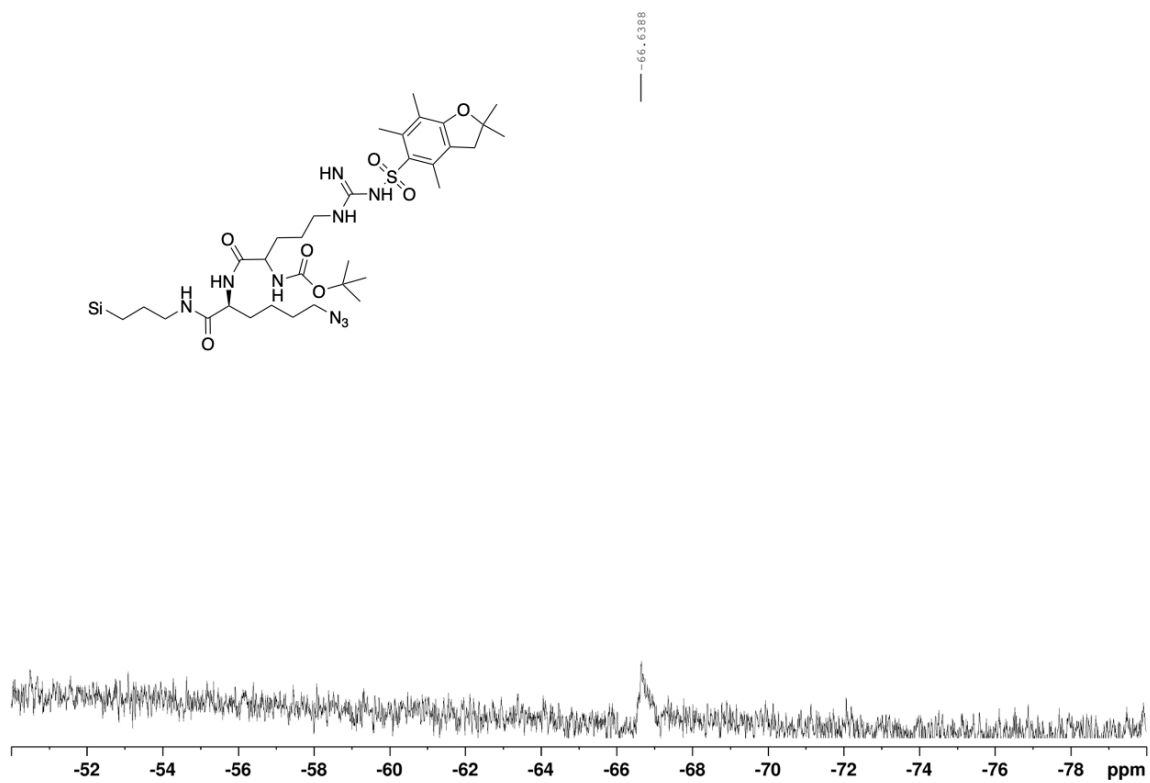
Liite 12. Yhdisteen **10** ^1H NMR-spektri

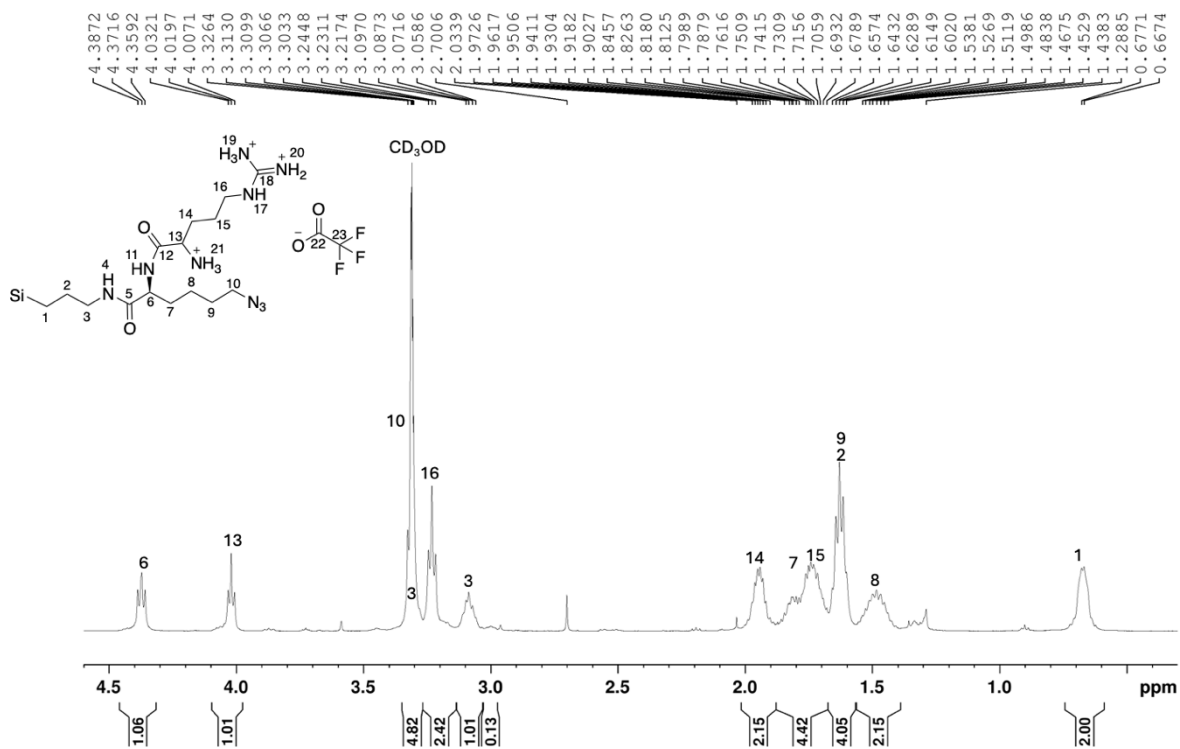
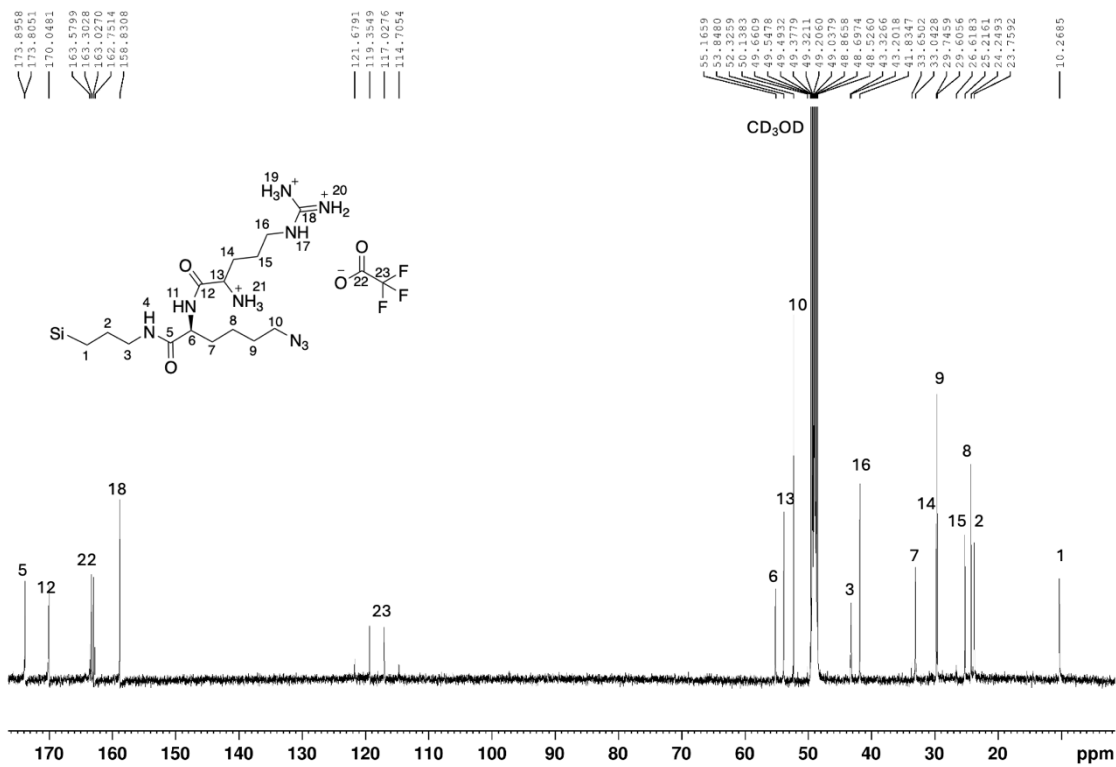


Liite 13. Yhdisteen 10 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri

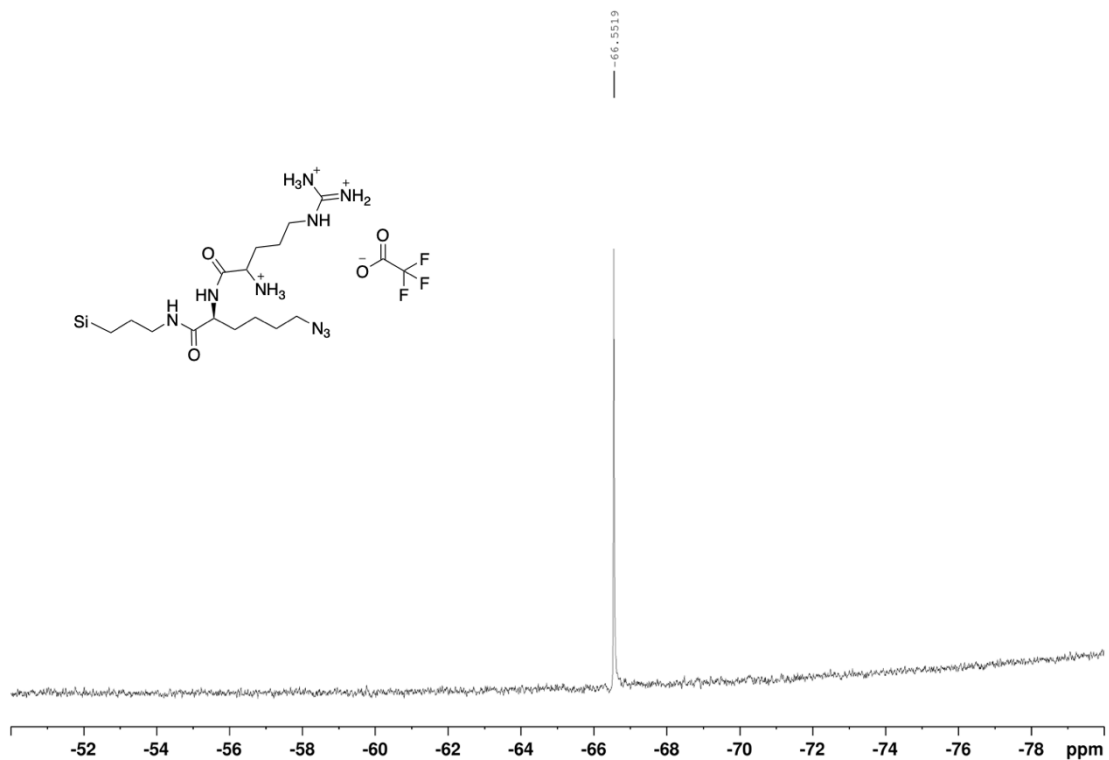


Liite 14. Yhdisteen 10 $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri

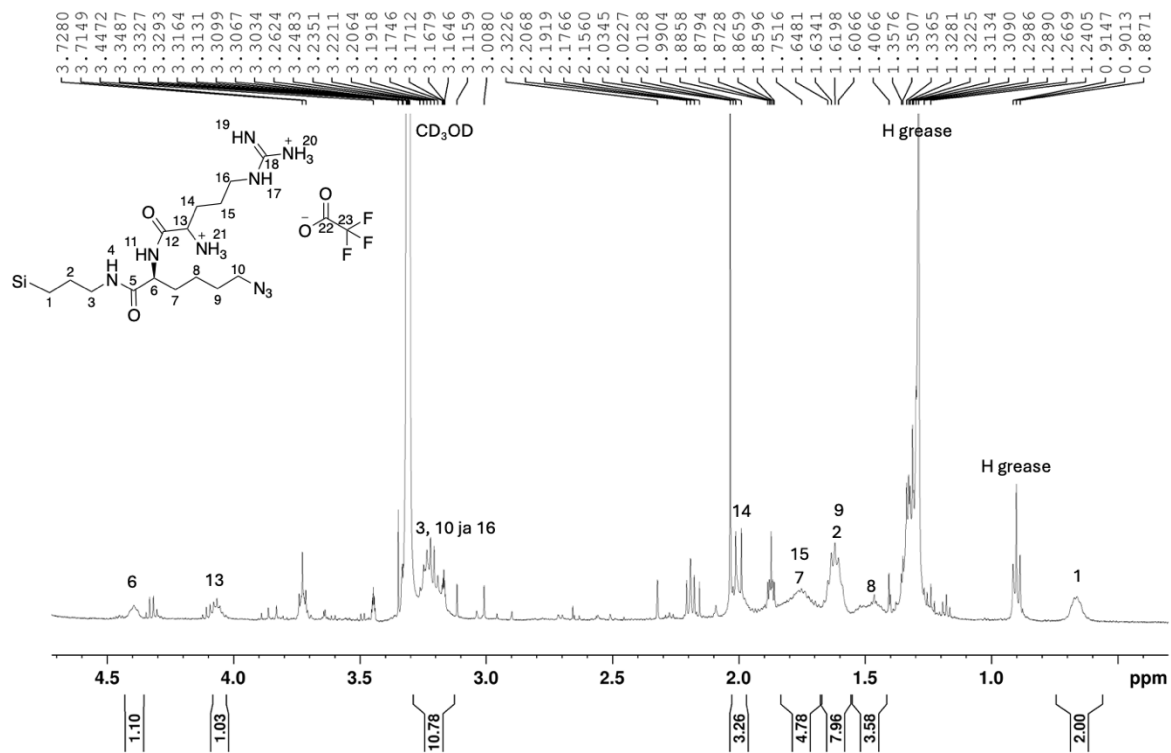


Liite 15. Yhdisteen 11 ^1H NMR-spektriLiite 16. Yhdisteen 11 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri

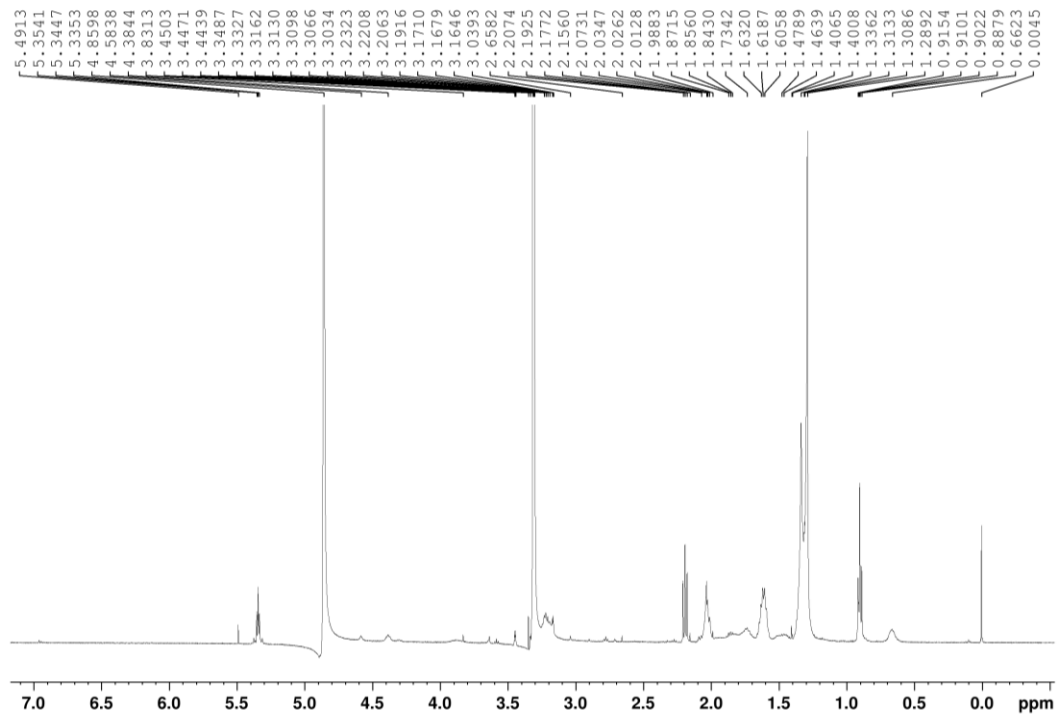
Liite 17. Yhdisteen 11 $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ NMR-spektri



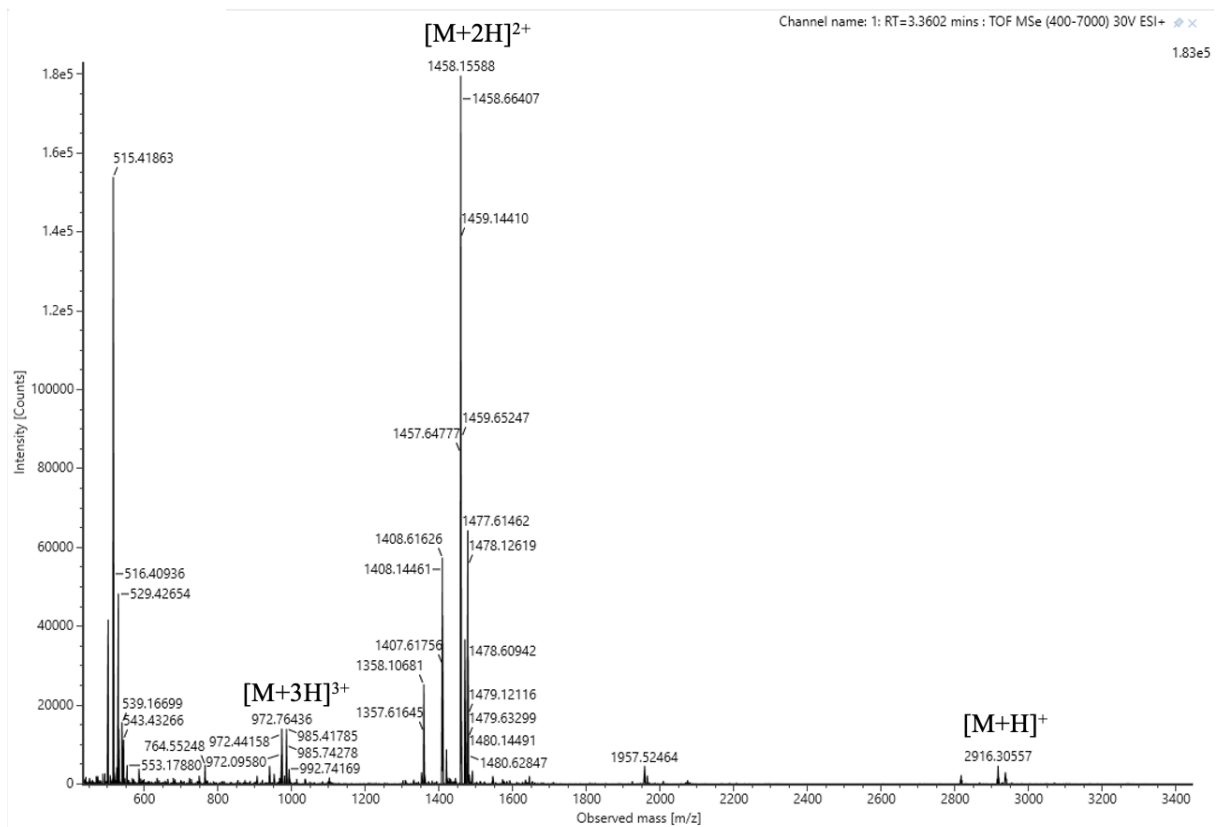
Liite 18. Yhdisteen 12 ^1H NMR-spektri



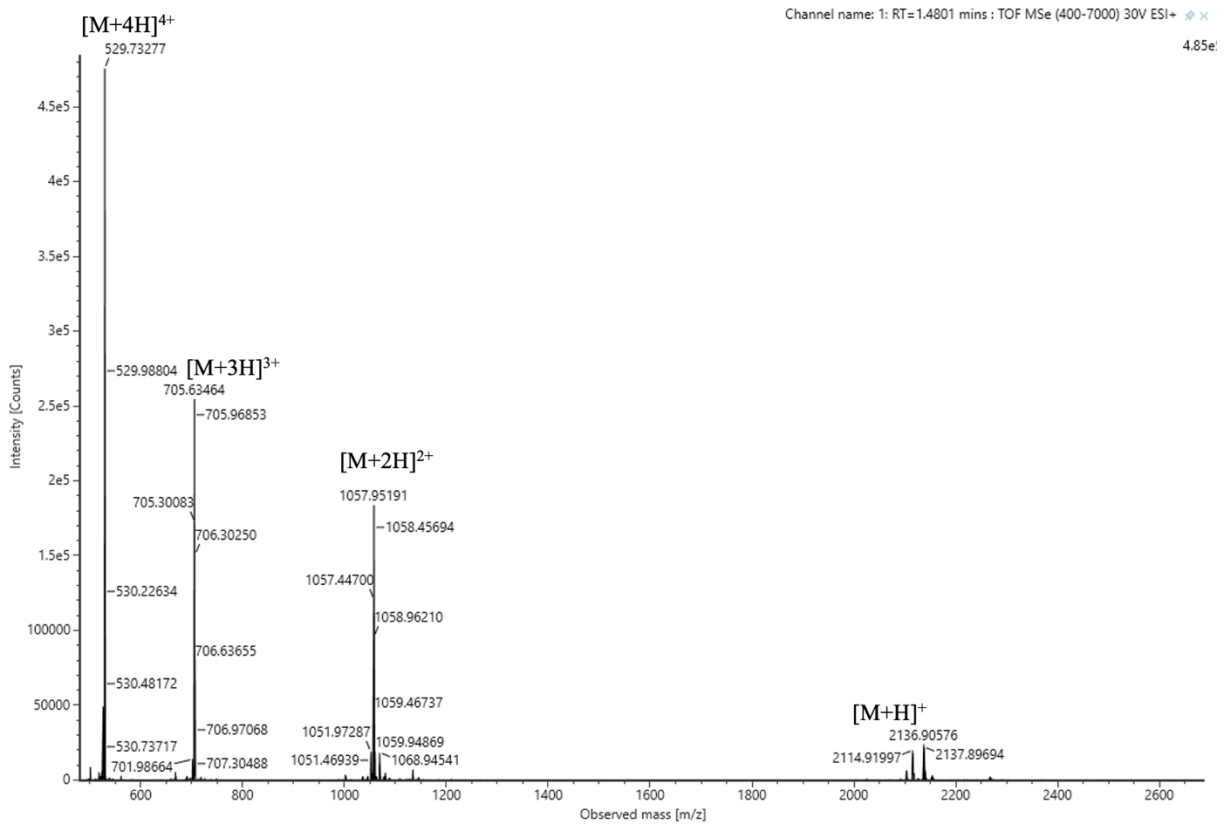
Liite 19. Yhdisteen 12 ^1H NMR-spektri etterisaostuksen jälkeen



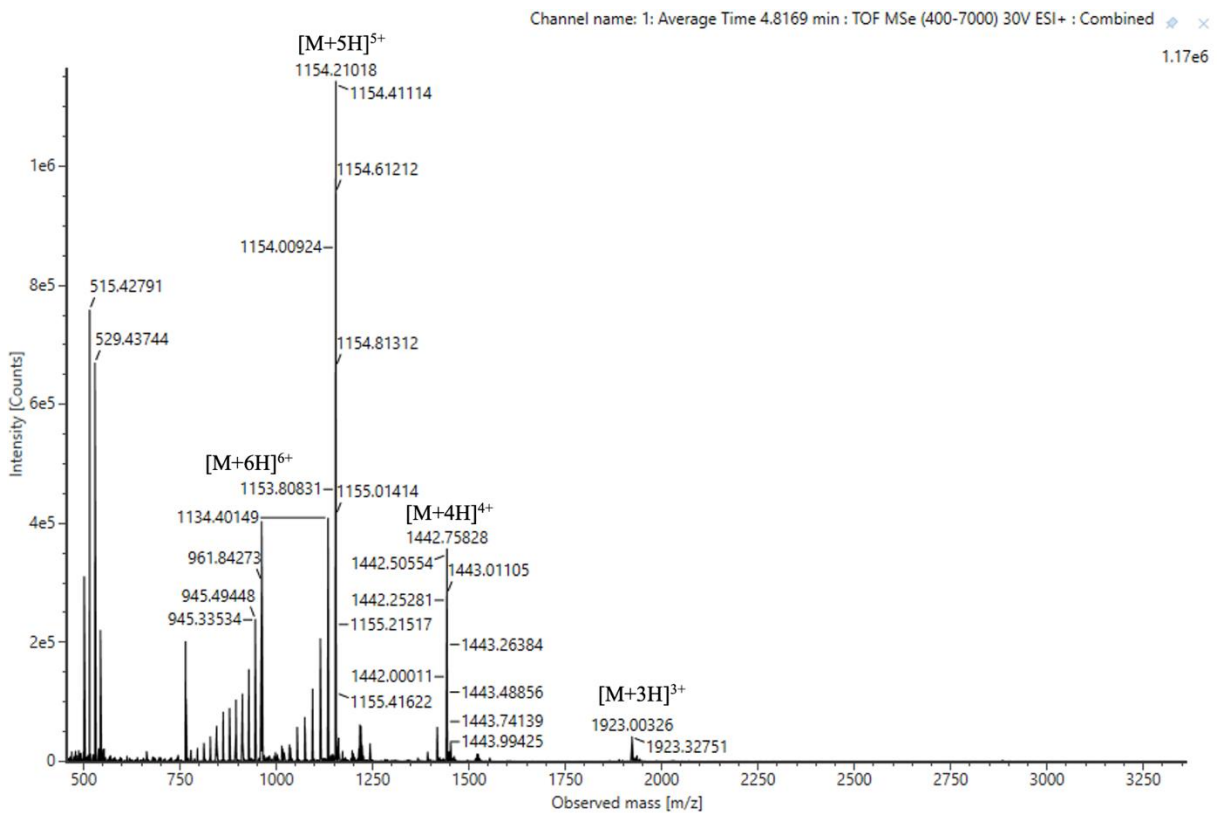
Liite 20. Yhdisteen 5 massaspektri



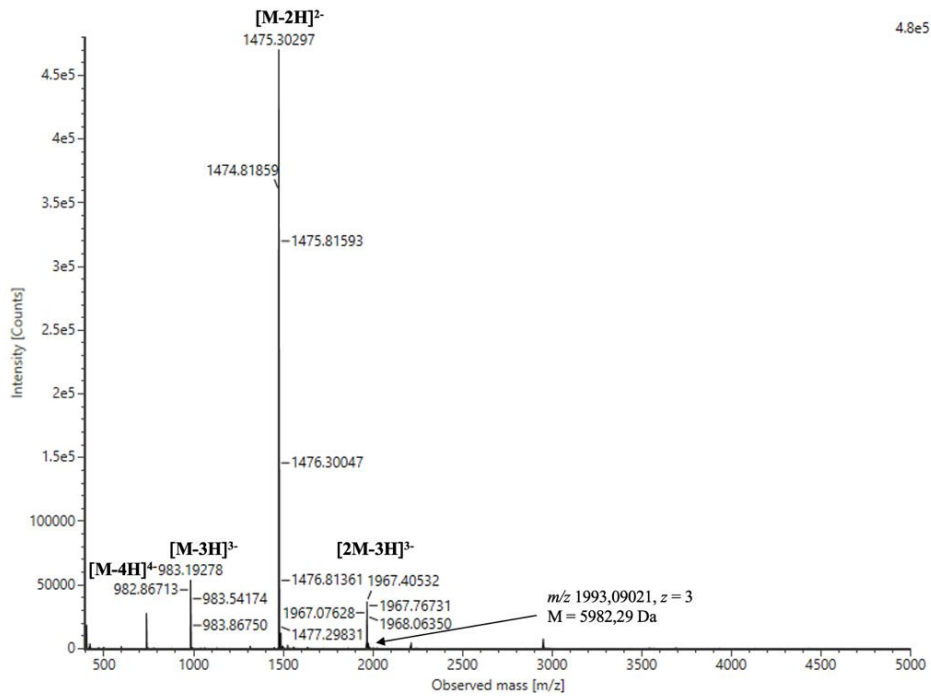
Liite 21. Yhdisteen 6 massaspektri



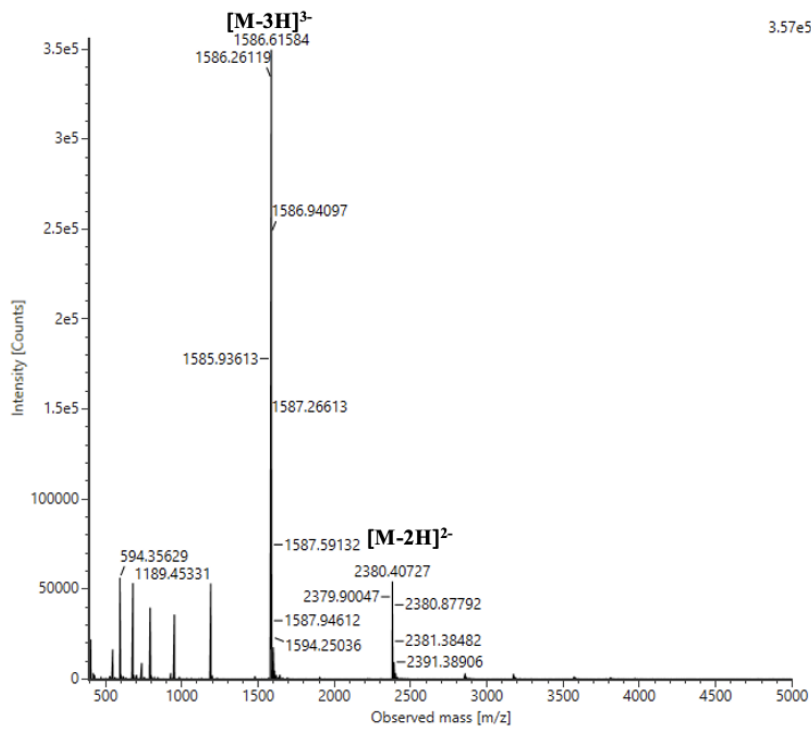
Liite 22. Yhdisteen 8 massaspektri



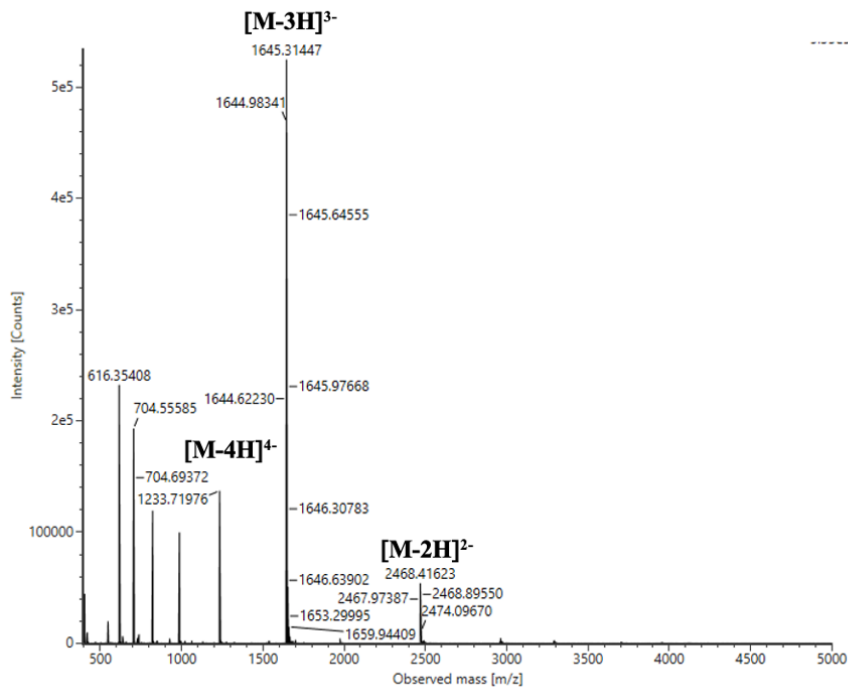
Liite 25. ON7 massaspektri



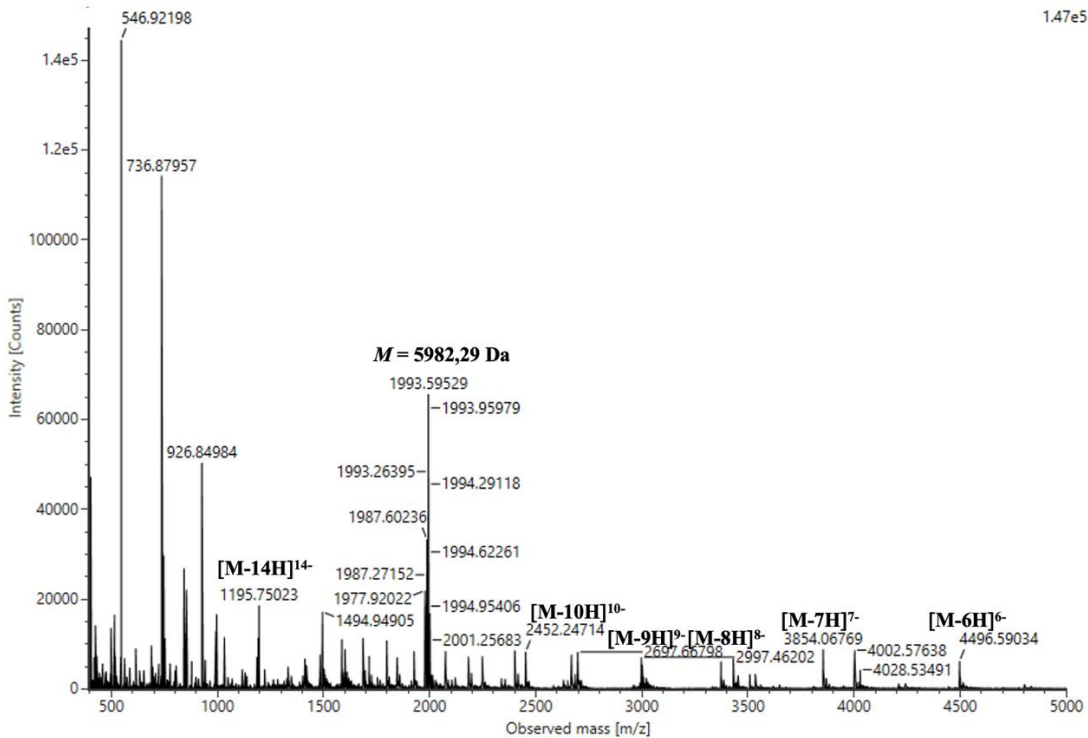
Liite 26. ON8 massaspektri



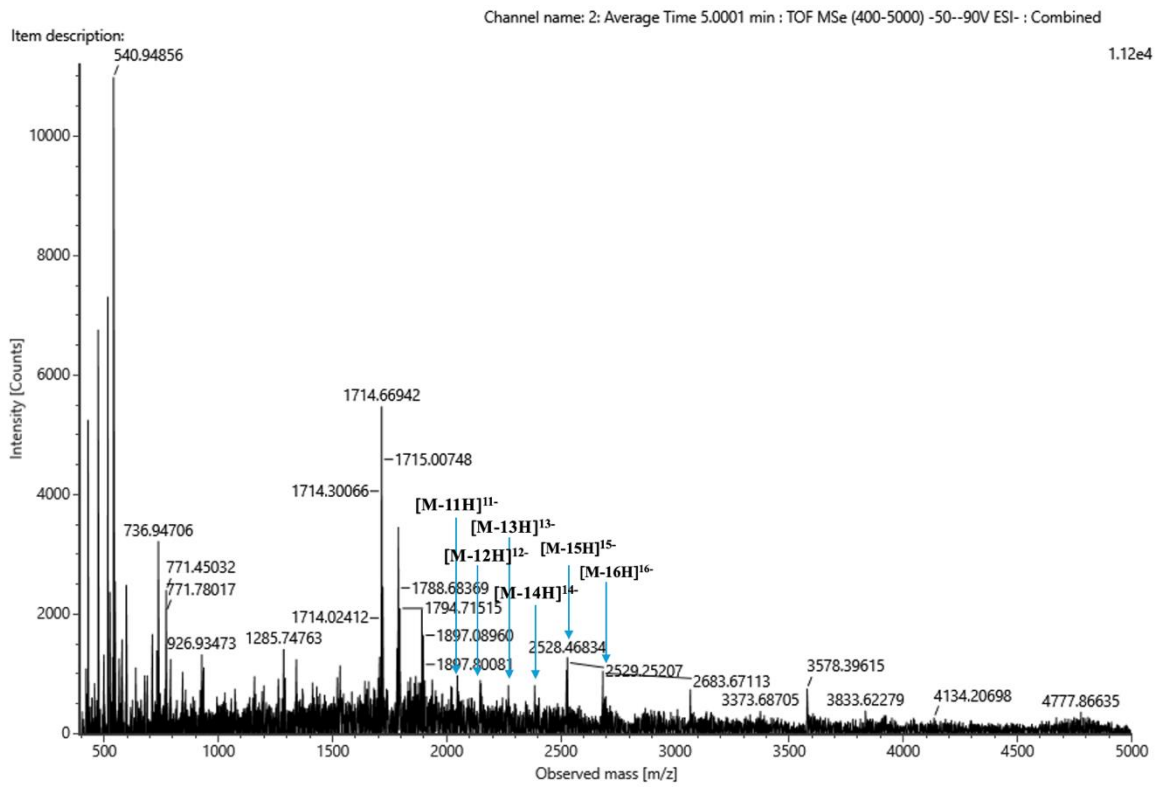
Liite 27. ON9 massaspektri



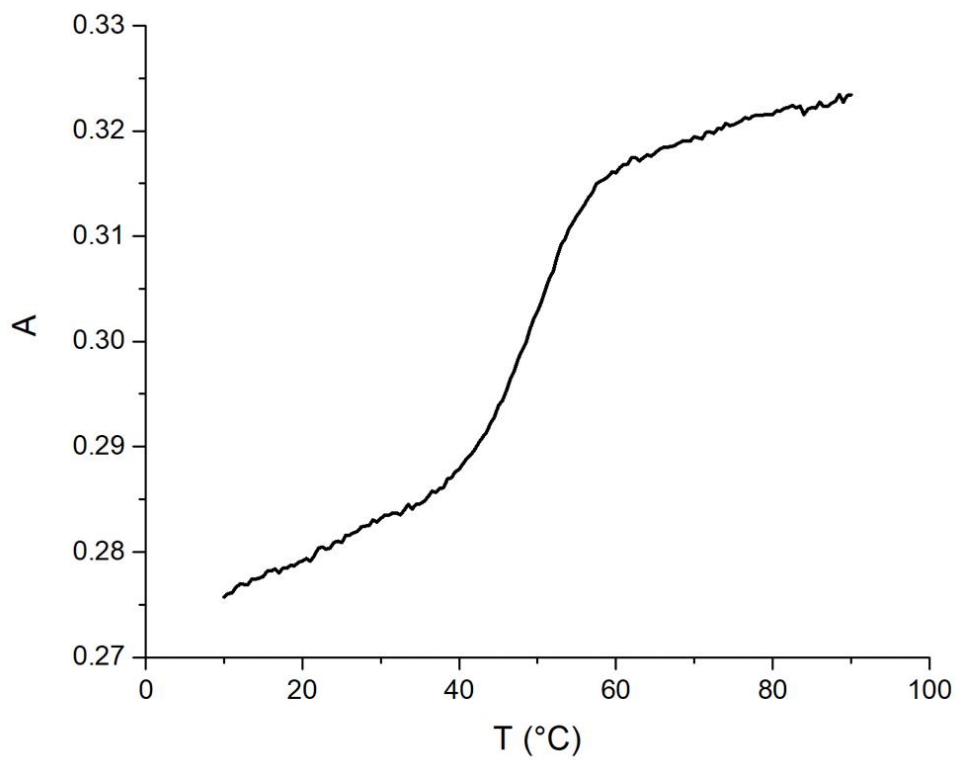
Liite 28. Yhdisteen 13 massaspektri

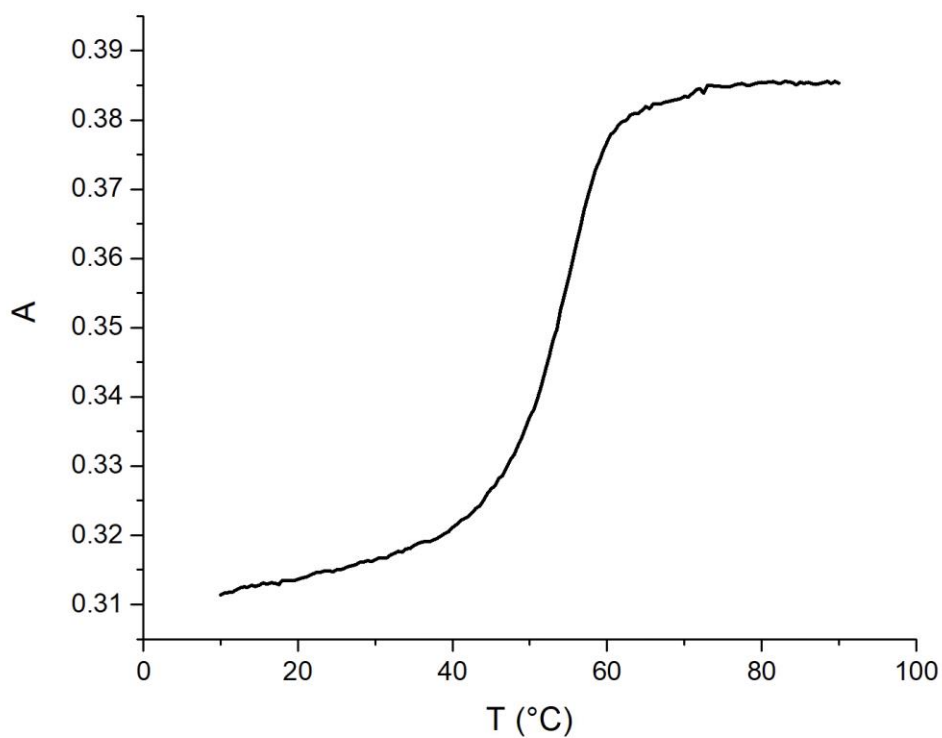
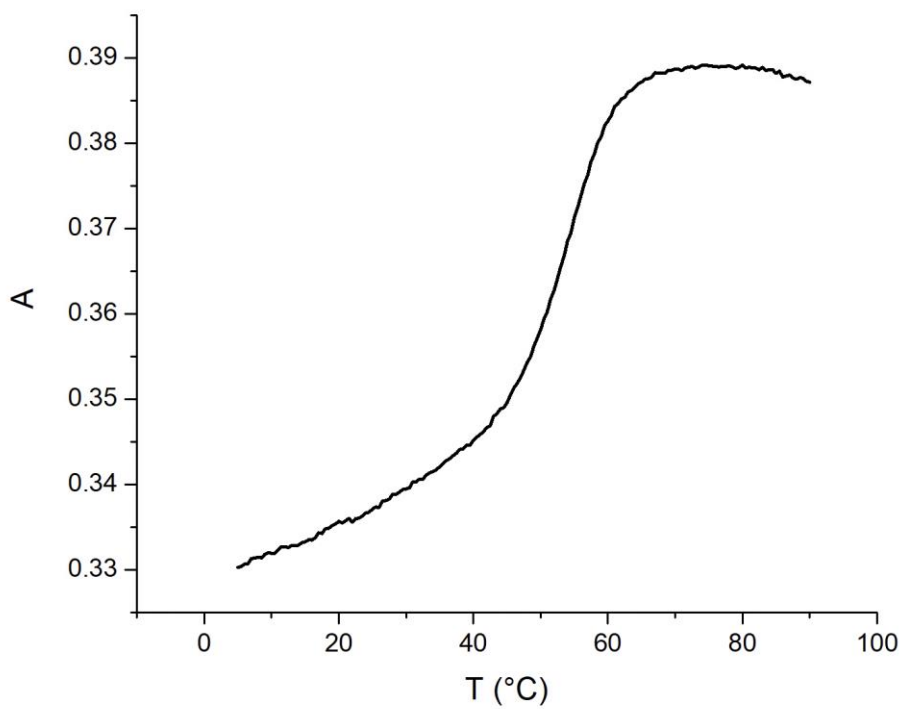


Liite 29. Yhdisteen 14 massaspektri



Liite 30. ON7 ja ON5:n muodostaman dupleksin sulamislämpötilaprofiili



Liite 31. ON9 ja ON5:n muodostaman dupleksin sulamislämpötilaprofiili**Liite 32.** Pallonukleinihapon 13 ja ON5:n muodostaman sekundäärirakenteen sulamislämpötilaprofiili

Liite 33. Pallonukleinihapon **14** ja **ON5**:n muodostaman sekundäärirakenteen sulamislämpötilaprofiili

