



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

siRNA-pallonukleinihappojen synteesi silmänpohjan ikärappeuman hoitoon

Ann-Mari Yliperttula

Kemia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

19.6.2025

Turku

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

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Ann-Mari Yliperttula

Otsikko: siRNA-pallonukleiinihappojen synteesi silmänpohjan ikärappeuman hoitoon

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

Sivumäärä: 48 sivua + liitteet 2 sivua

Päivämäärä: 19.6.2025

RNA-interferenssi on soluissa luontaisesti ilmenevä mekanismi, jonka avulla vieraat nukleiinihapot voivat vaikuttaa solun geeniekspressioon ja proteiinintuotantoon. RNA-interferenssin kautta vaikuttavat pienet häiritsevät RNA:t eli siRNA:t ja mikro-RNA:t eli miRNA:t. RNA-interferenssiin pohjautuvilla lääkehoidoilla voidaan kohdentaa siRNA-lääkkeitä geneettisiä sairauksia vastaan. Maailmanlaajuisesti yleisin sokeuteen johtava sairaus, silmänpohjan ikärappeuma, kehittyy verisuonten endoteelikasvutekijä VEGF:n epätavallisen korkean ilmenemisen kautta. Sairauden etenemistä voitaisiin pystyä estämään tai hidastamaan VEGF-kohdennetulla RNA-interferenssiin perustuvalla siRNA-hoidolla. Muokkaamattomalla siRNA:lla on haasteita vapaan kulkeutumisen kanssa soluun. Erilaiset muokkaukset ja kantajastrategiat ovat osoittautuneet tarpeellisiksi keinoiksi parantaa terapeuttien oligonukleotidien kuljetinominaisuuksia. Kantajastrategioihin lukeutuvat muun muassa molekulaariset pallonukleiinihapot, joiden rakennetta pystytään muokkaamaan ydinrakenteen valinnalla ja pintamuokkausten kautta.

Työn tavoitteena oli syntetisoida kontrolligeeni GAPDH:lle komplementaariset siRNA-oligonukleotidit tarvittavine muokkauksineen ja koota eri ydinrakenteilla (C60-fullereeni sekä 8- ja 10-kätinen atsidimuokattu silseskvioksaani) varustellut pallonukleiinihapot erilaisilla pintamuokkauksilla (polyetyleeniglykoli ja kolesteroli). Valmistettujen nanopartikkeleiden solun sisäänottoa tutkittiin ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja ARPE-19:n soluissa. Sisäänottokokeet analysoitiin virtausytometrisesti seuraten oligonukleotideihin kiinnitettyä FAM-fluoreseiinileimaa.

Kaikki halutut oligonukleotidit syntetisoitiin onnistuneesti. C60-fullereeni- ja 8-kätisen silseskvioksaaniydinrakenteeseen pohjautuvat pallonukleiinihapporakenteet saatiin syntetisoitua onnistuneesti. 10-kätisen silseskvioksaaniydinrakenteen synteessin viimeisessä reaktiovaiheessa kohdattiin ylitsepääsemättömiä haasteita, jolloin 10-kätisiä pallonukleiinihappoja ei päästy ollenkaan tutkimaan solukokeissa. Pääasialliset syyt reaktion epäonnistumiselle ovat epäsuotuisat steeriset tekijät sekä liian tiheä pintavaraus muodostuvassa pallonukleiinihapporakenteessa, jotka johtivat reaktion pysähtymiseen ennen lopputuotteen muodostumista. Valmistettujen rakenteiden solukokeet saatiin suoritettua onnistuneesti ja luotettavasti käyttäen riittävää määrää replikaatteja. Erot tuloksissa olivat suhteellisen pieniä. PEGylointi ei tuonut huomattavaa etua sisäänottoon. Kahdesta eri pitoisuudesta suuremman kolesterolimäärän sisältävät pallonukleiinihapot (1:1 vs. 1:3) kasvattivat solun sisäänottoa. Kolesterolipitoisuuden aiheuttamia ongelmia esimerkiksi aggregaation suhteen ei huomattu. Vapaita oligonukleotidejä verratessa kolesterolimuokkaus toi huomattavimman positiivisen eron solun sisäänotossa.

Tulosten avulla saatiin alustavia tuloksia liittyen siRNA-pallonukleiinihappojen potentiaalisuuteen silmänsairauden hoidossa. Saadut tulokset yhdessä myöhemmin tehtävien geenihiljennys- ja sytotoksisuuskokeiden kanssa luovat kokonaiskuvan, jonka avulla rakenteiden tehokkuutta ja luotettavuutta sairauden hoidossa voidaan arvioida entistä tarkemmin.

Avainsanat: terapeutitset siRNA:t, molekulaariset pallonukleiinihapot, silmänpohjan ikärappeuma

Master's thesis

Subject: Chemistry

Author(s): Ann-Mari Yliperttula

Title: Synthesis of siRNA Spherical Nucleic Acids for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration

Supervisor(s): Toni Laine, Pasi Virta

Number of pages: 48 pages + 2 supplementary pages

Date: 19 June 2025

RNA interference is a naturally occurring mechanism by which foreign nucleic acids can affect the genetic expression and protein synthesis on the cell. The main effectors of RNA interference are small interfering RNAs or siRNAs and micro-RNAs or miRNAs. Therapeutic treatments based on RNA interference enable the use of therapeutic siRNAs and miRNAs for treating genetic illnesses. The most common illness causing blindness worldwide is age-related macular degeneration or AMD is caused by the abnormally high expression of the vascular endothelial growth factor or VEGF. VEGF-silencing siRNA-treatments based on RNA-interference could be a possible way of slowing down or halting the progression of AMD. Unmodified siRNA faces some difficulties with free uptake to the cell, which establishes the need for different modifications and carrier strategies for therapeutic oligonucleotides (ONs). Molecular spherical nucleic acids (MSNAs) are an example of a carrier strategy, where a bigger ON content could be carried into the cell via receptor-mediated endocytosis. Several options for modifying the core and surface structures of MSNAs bring many possibilities for forming an efficient and biocompatible carrier structure, which could answer the questions regarding ON delivery.

The aims of this study were to synthesize complementary siRNA-ONs with a sequence coding a control gene GAPDH and assemble several MSNAs using different azide-modified core structures (C60-fullerene and 8- & 10-armed silsesquioxane) and surface modifications (polyethylene glycol and cholesterol). The cell uptake of the prepared nanoparticles was assessed with the human retinal pigment epithelium ARPE-19 cell line and the results were analyzed with flow cytometry following a FAM-fluorescent label attached to the sense-ON strand.

All the desired ONs and the MSNAs with the C60 fullerene and 8-armed silsesquioxane core structures were successfully synthesized. On the other hand, when preparing the 10-armed silsesquioxane MSNA, some great challenges were faced. As a result, the 10-armed MSNA structure couldn't be investigated via cell uptake and flow cytometry analysis. Steric hindrance and dense surface charges ended up being the most probable reasons causing the reaction to fail. The cell uptake studies were successfully done with synthesized nanoparticles. The results had only slight differences with PEGylation showing the most minimal changes compared to the control sample with untreated cells. MSNAs with cholesterol showed slightly more increased uptake with the higher cholesterol:antisense ratio giving the best results. Any aggregation issues with the cholesterol-containing structures weren't detected. When comparing the free hybridized ONs without any core structures, the cholesterol modification resulted in a significant increase in uptake.

These preliminary results highlighted some possibilities in the use of MSNAs as delivery vehicles for therapeutic ONs. These results together with some further gene silencing and cytotoxicity studies will help us to better understand the possible efficacy and usability of MSNAs for genetic illnesses.

Keywords: therapeutic siRNAs, molecular spherical nucleic acids, age-related macular degeneration

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
1.1	Pienet häiritsevät RNA:t ja RNA-interferenssi.....	1
1.2	Markkinoilla ja kehitteillä olevat oligonukleotidilääkkeet.....	2
1.3	RNA:n suunnittelu ja muokkaus	5
1.4	Nykyhaasteet siRNA-kuljetuksessa	7
1.5	Oligonukleotidien kuljetinstrategiat.....	7
1.5.1	Pallonukleiinihapot oligonukleotidien kuljettimina.....	9
1.6	Silmänpohjan ikärappeuma ja ARPE-19-solumalli.....	15
1.7	Yhteenvedo ja työn tarkoitus	17
2	Kokeelliset menetelmät	19
2.1	Oligonukleotidisynteetit.....	19
2.1.1	Antisense-RNA	19
2.1.2	PEG-antisense RNA.....	21
2.1.3	Sense RNA.....	23
2.1.4	6-FAM-sense RNA.....	24
2.1.5	BCN-sense RNA.....	26
2.2	10-kätisen COSS-ydinrakenteen synteesi	29
2.3	Pallonukleiinihappojen kokoaminen.....	31
2.3.1	Fullereeniydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi.....	31
2.3.2	T8-COSS-ydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi.....	32
2.3.3	T10-COSS-ydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi.....	35
2.4	Pallonukleiinihappojen hybridisaatio ja sisäänottokokeiden näytevalmistus	40
2.5	ARPE-19 solujen sisäänottokokeet.....	41
3	Tulokset ja niiden tarkastelu	43
3.1	Synteetit.....	43
3.2	Virtaussytometrinen analyysi siRNA-näytteiden solujen sisäänottokokeille	44
4	Johtopäätökset	46
5	Viitteet	49
6	Liitteet	56

Lyhenneluettelo

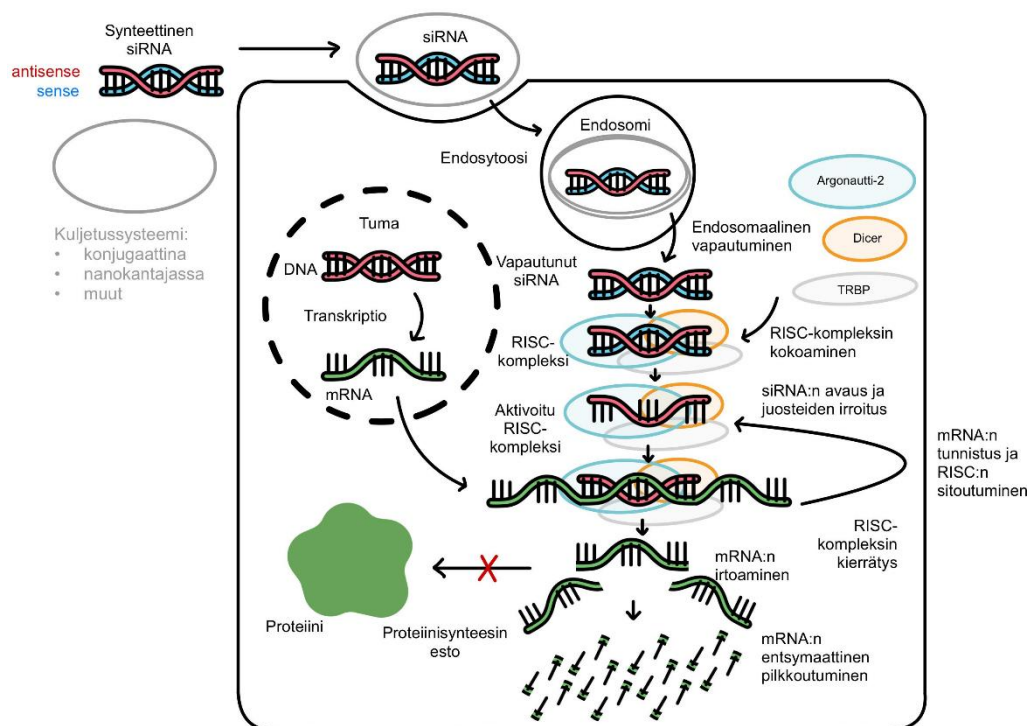
RNA	Ribonukleiinihappo, ribonucleic acid
siRNA	Pieni häiritsevä RNA, small interfering RNA
mRNA	Lähettilä-RNA, Messenger RNA
miRNA	Mikro-RNA
RNAi	RNA-interferenssi, RNA interference
RISC	RNA-indusoitu hiljennyskompleksi, RNA induced silencing complex
Ago-2	Argonautti 2
FDA	Yhdysvaltain Elintarvike- ja lääkevirasto, Food and Drug Administration
LNP	Lipidinanopartikkeli
GalNAc	N-asetyyyligalaktosamiini
AMD	Silmänpohjan ikärappeuma, age-related macular degeneration
PEG	Polyetyleeniglykoli
COSS	Syklinen oligomeerinen silseskvioksaani, cyclic oligomeric silsesquioxane
C60	Buckminsterfullereeni
SNA	Pallonukleiinihappo, Spherical Nucleic Acid
SPAAC	Rengasjännitteinen alkyyni-atsidi sykloadditio, strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
RPE	Verkkokalvon pigmenttiepiteeli, retinal pigment epithelium
VEGF	Verisuonten epiteelikasvutekijä, vascular endothelial growth factor
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
BCN	Bisyklononyyni
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, phosphate buffered saline
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasikromatografia
PAGE	Polyakrylamidigeelielektroforeesi
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasetatti
ACN	Asetonitriili
NFW	Nukleasivapaa vesi, nuclease-free water
ARPE-19	Ihmisen silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja

1 Johdanto

1.1 Pienet häiritsevät RNA:t ja RNA-interferenssi

Pienet häiritsevät RNA:t eli siRNA:t (eng. Small Interfering RNA) ovat kaksijuosteisia RNA-molekyylejä, jotka säätelevät lähetti-RNA:n (eng. Messenger RNA, mRNA) toimintaa RNA-interferenssin (eng. RNA-interference, RNAi) kautta. siRNA-molekyylin juosteista toista kutsutaan antisense-juosteeksi (eng. antisense strand) ja sille komplementaarista juostetta vastaavasti sense-juosteeksi (eng. sense strand). Edellä mainituista antisense-juoste on lähetti-RNA:n kohdesekvenssille komplementaarinen ja käynnistää RNA-välitteisen geenin hiljentymisen Watson-Crick-emäspariutumisella.¹ Yleisimmin siRNA-molekyylin muodostuu 19:stä toisilleen komplementaarista emäsparista sekä kahdesta ylimääräisestä nukleotidista juosteiden 3'-päissä².

RNAi löydettiin vuonna 1998 alun perin *C. elegans*-sukkulamadoilla tehdyissä kokeissa. Sen havaittiin olevan kaikilla eukaryoottisolulla luontainen puolustusmekanismi vieraiden nukleiinihappojen päästessä solun sisään vaikuttaen solun geeniekspressioon ja proteiinituotantoon.³ RNAi:n avulla päästään hoitamaan geneettisiä sairauksia, jotka olisivat muilla terapiamuodoilla saavuttamattomissa. Löydös tuotti myös lääketieteen Nobelin palkinnon vuonna 2006 Ander Firelle ja Craig Mellolle⁴.



Kaavio 1: RNA-interferenssin mekanismi, mukailtu lähteestä Friedrich ym.²

RNAi (kaavio 1) käynnistyy pitkän kaksijuosteisen tai hiusneulamaisen siRNA:n sisäänotolla soluun, jossa endoribonukleaasi Dicer III prosessoi sen 19–23 nukleotidin pituiseksi siRNA:ksi (mature siRNA). Terapeuttiset kemiallisesti syntetisoidut siRNA:t eivät tarvitse tätä Dicerin pilkkomisvaihetta. siRNA liittyy niin sanottuun RISC-kompleksiin (RNA-induced silencing-complex), jossa Argonautti-2 (Ago-2) proteiini pilkkoo siRNA:n sense-juosteen. Jäljelle jäänyt antisense-juoste ohjaa muodostuneen RISC-kompleksin sitoutumaan komplementaariseen kohde-mRNA:han, joka pilkkotaan Ago-2-proteiinin toimesta. Tyypillisesti Ago-2-proteiini pilkkoo mRNA:n mallijuosteen nukleotidien 10 ja 11 välistä. mRNA:n pilkkoutumisen takia tapahtunut geenin hiljennys on tehokasta, sillä mekanismi on katalyyttinen. RISC-kompleksiin jäänyt antisense-juoste vapautuu mRNA:n pilkkomisen jälkeen uudelleen käytettäväksi ja voi sitoutua uudelleen seuraavaan mRNA-molekyylisiin. Tästä syystä myös erittäin alhaisilla, jopa pikomolaarisilla konsentraatioilla, voidaan saada aikaan tehokas vaste geenin hiljennyksessä.² siRNA:n RNAi:n käynnistävä vaikutus voi kestää tunneista useampaan päivään. Terapeuttisen vasteen aikaansaaminen vaatii kuukausittaista annostelua.^{3,5}

1.2 Markkinoilla ja kehitteillä olevat oligonukleotidilääkkeet

Tutkielman kirjoitushetkellä (huhtikuu 2025) kuusi siRNA-läkettä on hyväksytty markkinoille Amerikan elintarvike- ja lääkeviraston (engl. Food and Drug Administration, FDA) toimesta (taulukko 1)⁶. Vuonna 2018 hyväksytty ensimmäinen siRNA-lääke Patisiran⁷ kehitettiin perinnöllisen transtyretiinivälitteisen amyloidoosin hoitoon. Patisiran on toistaiseksi ainoa FDA-hyväksytty siRNA-lääke, joka hyödyntää jonkinlaista kantajastrategiaa. Kantajana toimii lipidinanopartikkeli (engl. lipid nanoparticle, LNP), jolla siRNA:n spesifisyys- ja kuljetusominaisuuksia parannetaan. Seuraavaksi hyväksytyt lääkkeet Givosiran⁸ (2019) ja Lumasiran⁹ (2020) hyödyntävät *N*-asetyyyligalaktosamiini (GalNAc)-muokkausta parantaen lääkkeiden kuljetusominaisuuksia. Givosiran keskittyy akuutin maksaporfyrian hoitoon ja Lumasiran puolestaan tyypin 1 primaarisen hyperoksalurian hoitoon. Vuonna 2021 hyväksytty Inclisiran¹⁰ on myös GalNAc-muokattu siRNA-lääke. Inclisiran on kohdennettu primaarisen hyperkolesterolemian hoitoon, ja lääkkeen tuotanto vaikutti myös suuresti oligonukleotidisynteesituotteiden kasvavaan kysyntään. Vuosina 2022 ja 2023 hyväksyttiin lääkkeet Vutrisiran¹¹ ja Nedosiran¹² perinnöllisen transtyretiinivälitteisen amyloidoosin ja tyypin 1 primaarisen hyperoksalurian hoitoon. Myös nämä hyödyntävät edellä esiteltyä GalNAc-muokkausta. Kaikki lääkkeet vaativat toistuvaa ja säännöllistä annostelua: Patisiran annostellaan suonensisäisesti, kaikki muut edellä mainituista ihonalaisella lihas- tai rasvakudokseen pistettävällä injeksiolla. Kaikki tähän mennessä hyväksytyt lääkkeet myös

hyödyntävät systeemistä annostelua, jolloin maksan vaikutukset lääkkeen jakautumiseen ovat merkittävät.^{13,14}

Taulukko 1: FDA-hyväksytyt siRNA-lääkkeet^{2,6}

Lääke	Merkki	FDA-hyväksyntä	Yritys	Kuljetus-systeemi	Annostelu	Sairaus
Patisiran	Onpattro	2018	Alnylam	LNP-siRNA	suonensisäisesti	Perinnöllinen transtyretiinivälitteinen amyloidoosi
Givosiran	Givlaari	2019	Alnylam	GalNAC-siRNA	ihonalaisesti	Akuutti maksaporfyria
Lumasiran	Oxlumo	2020	Alnylam	GalNAC-siRNA	ihonalaisesti	Tyypin 1 Primaarinen hyperoksaluria
Inclisiran	Leqvio	2021	Novartis	GalNAC-siRNA	ihonalaisesti	Primaarinen hyperkolesterolemia
Vutrisiran	Amvuttra	2022	Alnylam	GalNAC-siRNA	ihonalaisesti	Perinnöllinen transtyretiinivälitteinen amyloidoosi
Nedosiran	Rivfloza	2023	Novo Nordisk	GalXC™ RNAi	ihonalaisesti	Tyypin 1 Primaarinen hyperoksaluria

Ensimmäiset AMD-kohdennetut oligonukleotiditeknologiaa hyödyntävät kliiniset tutkimukset käynnistettiin jo vuosituhanen vaihteessa. Fomivirsen (Vitraveeni¹⁵) on 21-meerinen antisense-oligonukleotidi, joka kohdentuu sytomegaloviruksen aiheuttamaa verkkokalvorappeumaa vastaan.¹⁶ Lääke hyväksyttiin markkinoille vuonna 1998 ja sitä annosteltiin intravitreaalisena injektiona. Fomivirsenin tutkimus ja käyttö oli suurimmillaan AIDS-tapausten ollessa huipussaan, sillä viruksen tartunnat aiheuttivat hoitoa vaativia oireita vain immuunikatoisilla potilailla. Fomivirsen siten poistui markkinoilta, kun AIDS-tapauksetkin vähenivät.¹⁷ Pegaptanib¹⁸ (Macugen) on PEGyloitu VEGF-a-kohdentuva RNA-aptameeri, jolla hoidetaan neovaskulaarista AMD:tä. Lääke hyväksyttiin ensimmäisen kerran FDA:n toimesta markkinoille vuonna 2004. Pegaptanib oli markkinoille hyväksymisen jälkeen hetken pääasiallinen hoitomuoto neovaskulaarista AMD:tä ja diabeettista retinopatiaa vastaan, kunnes vasta-aineelääkkeiden (ranibizumab ja aflibercept) huomattiin johtavan tehokkaampaan ja pidempiaikaisempaan VEGF:n hiljennykseen.^{19,20}

Silmäsairauksiin kohdennettuja siRNA-lääkkeitä on myös ollut useampi kehitteillä (taulukko 2). RNAi-terapialle silmä on suotuisa kohde, koska se mahdollistaa rajatun sijaintinsa ansiosta paikallisen siRNA:n annostelun topikaalisesti (paikallisesti) tai injektioilla²¹. Useat silmän taudit, kuten silmänpohjan ikärappeuman (engl. age-related macular degeneration, AMD)

lisäksi glaukooma, kuivan silmän syndrooma ja diabeettinen retinopatia sekä useat perinnölliset verkkokalvosairaudet ovat kohteina siRNA-lääkekehityksessä.

siRNA-027²² ja Bevasiranib²³ kohdentuvat verisuonten endoteelikasvutekijä VEGF-geeniin tai sen reseptoriin estäen verisuonten ei-toivottua muodostusta neovaskulaarisessa eli uudissuonia muodostavassa AMD:ssä. Molempien tutkimus jouduttiin keskeyttämään kliinisissä vaiheissa havaitun huonon tehokkuuden takia, siRNA-027:llä havaittiin myös immuunivasteen käynnistäviä vaikutuksia. Tivanisiran kohdentuu TRPV1 (engl. transient receptor potential vanilloid 1)-kanavaan, jonka olisi tarkoitus vähentää kuivan silmän syndroomassa esiintyvää silmän kipua. Bamosiran kohdentuu ADRB2 (engl. β 2-adrenergic receptor)-reseptoriin, jonka hiljennyksen tulisi vähentää lasiaisen nesteen tuotantoa ja siten alentaa silmänpainetta. Codosiran estää verkkokalvon gangliosolujen vaurioitumista ja optista neuropatiaa kohdentamalla kaspasi-2-entsyymiin (CASP2). PF-0423655 kohdentuu hypoksiaan vaikuttavaan RTP801-geeniin, joka yliekspressoituu diabeettisessa retinopatiassa ja AMD:ssä. PF-0423655:n yhdistämistä lääkeaine Ranibizumabin kanssa on kokeiltu myös toimintaominaisuuksien kehittämiseksi, mutta tulokset eivät olleet merkittävästi parempia. RXI-109 kohdentuu tukikudoksen kasvutekijägeeniin (connective tissue growth factor, CTGF), joka hiljentyessään vähentää verkkokalvon fibroosia eli arpeutumista. Vuonna 2023 Olix Pharma käynnisti tutkimuksen OLX10212:n kanssa neovaskulaarisen AMD:n hoitoon, tuloksia ei vielä julkaistu. OLX10212 hyödyntää CASi-RNA-terapiaa (engl. conditionally activated siRNA) hoitaen neovaskulaarista AMD:tä entistä kohdennetummin siRNA:an kiinnitetyn ligandin ja kohdesolua etsivän antisense-oligonukleotidisensorin avulla. Tätä kautta ligandi ja sensori löytävät tietyn haluttua biomarkkeria ekspressoivan solun johon kulkeutua, jolloin toiminnallinen siRNA vasta vapautuu geenihiljennystä varten²⁴. SYL1801 kohdentuu NRARP (engl. NOTCH-regulated ankyrin repeat protein)-proteiiniin ja vähentää VEGF-reitin ilmentymistä. NUDT21-lääkeaineen tutkimus on vuoden 2025 alussa uusin siRNA-lääkeaine, joka kohdentuu verkkokalvon blastooman hoitoon hiljentäen SMC1a (structural maintenance of chromosomes 1a)-geenejä ja siten toivottavasti hiljentäen syövän etenemistä. Edellä mainituista Tivanisiran, Bamosiran ja SYL1801 annostellaan topikaalisesti esimerkiksi silmätippuna, muut injektiona silmän lasiaiseen (intravitreaalinen).²⁵

Taulukko 2: kehitteillä olevat siRNA-lääkkeet silmäsairauksien hoitoon. Mukailtu lähteestä Ahn ym.²⁵, päivitetty tiedot kerätty osoitteesta www.clinicaltrials.gov.

Nimi	Systeemi	Kohdegeeni	Kohdesairaus	Annostelu	Tilanne 4/2025
siRNA-027	paljas siRNA	VEGFR1	neovaskulaarinen AMD	intravitr.	Keskeytetty, faasi 2 NCT00259753
Bevasiranib	paljas siRNA	VEGF	neovaskulaarinen AMD	intravitr.	keskeytetty, faasi 3 NCT00363714
Tivanisiran (SYL1001)	paljas siRNA	TRPV1	kuivan silmän syndrooma	topical	faasi 3 valmis NCT05310422, NCT04819269
Bamosiran (SYL040012)	paljas siRNA	ADRB2	kohonnut silmänpaine	topical	faasi 2 valmis NCT01739244
Codosiran (QPI-1007)	paljas siRNA	CASP2	primaarinen avokulmaglaukooma	intravitr.	faasi 2 valmis NCT01064505
PF-0423655	paljas siRNA	RTP801	diabeettinen retinopatia	intravitr.	faasi 2 valmis NCT01445899
RXI-109	paljas siRNA	CTGF	neovaskulaarinen AMD, verkkokalvon arpeutuminen	intravitr.	faasi 2, status ei tiedossa NCT02599064
OLX10212	CASi-RNA	ei ilmoitettu	neovaskulaarinen AMD	intravitr.	faasi 1 valmistelut NCT05643118
SYL1801	paljas siRNA	NRARP	neovaskulaarinen AMD	topikaalinen	faasi 2, status ei tiedossa NCT05637255
NUDT21	siRNA	SMC1A	retinoblastooma	intravitr.	faasi 1 valmistelut, NCT06424301

1.3 RNA:n suunnittelu ja muokkaus

Lääkeaineen farmakokineettiset ominaisuudet riippuvat dianoforista eli lääkeaineen molekyylipiirteistä, jotka vaikuttavat sen kuljetukseen ja jakautumiseen elimistössä. Oligonukleotidilääkkeen kohdalla dianoforin määrittää vahvasti sen kemiallinen rakenne sisältäen sokeri-, emäs- ja fosfaattiosan kemialliset modifikaatiot, yksi- tai kaksijuosteisuuden ja konjugaattirakenteen olemassaolon. Oligonukleotidin sekvenssi puolestaan vaikuttaa suoraan sen kohdentumiseen vaikuttaviin molekyylipiirteisiin eli farmakoforiin.²⁶

Kemiallisten modifikaatioiden avulla kasvatetaan muun muassa siRNA:n tehokkuutta ja suojautumista entsyymaattiselle hajotukselle. ”Off-target”-vaikutukset siRNA-molekyyleillä ei-

toivotun kohdegeenin kanssa ovat myös yleisiä, jolloin elimistön immuunivaste aktivoituu ja vieras RNA-materiaali poistetaan valkosolujen avulla elimistöstä. siRNA:n kemiallisen muokkauksen avulla näitä vaikutuksia voidaan heikentää. Erilaiset kemialliset modifikaatiot voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: fosfaatti-, emäs- ja sokerimodifikaatioihin. Edellä mainituista sokeri- ja fosfaattimuokkaukset ovat yleisimpiä. Sokeriosa sisältää usein 2'-F, 2'-*O*-metyyli ja 2'-*O*-metoksietyyli-modifikaatioita. siRNA:n fosfodiesterisidokset on usein korvattu osittain fosforotioaattisidoksilla. Näillä parannetaan siRNA:n affiniteettia, stabiilisuutta ja kuljetinominaisuuksia.²⁷

Kemiallisten modifikaatioiden lisäksi tulee pohtia sekvenssin suunnittelua. Ihannetapauksessa siRNA-molekyylin tulisi olla elimistön puolustusjärjestelmälle neutraali, tehokkaasti ja tarkasti kohdegeeniä pilkkova, pitkän puoliintumisajan omaava, kauan elimistössä kiertävä sekä muuten myrkytön ja sivuvaikutuksia aiheuttamaton.² Yleisimmin syntetisoidut siRNA-molekyylit ovat pituudeltaan 19–25-meerejä. Pidemmät, yli 25 emäsparin, sekä paljon U-emästä sisältävät siRNA-juosteet tunnustetaan helpommin puolustusjärjestelmän reseptorien toimesta, jolloin tehokkuus voi laskea.^{28,29} On myös havaittu, että juosteen G/C-pitoisuudella on merkitystä siRNA:n toiminnan suhteen. Yleisenä periaatteena pidetään Reynoldsin ryhmiseen aloittamaa teoriaa sitä, että suunnitellun siRNA:n C/G-emäspitoisuuden tulisi olla 30–60 %:n välillä³⁰. Tätä alhaisempi osuus johtaa heikkoihin ja epäspesifeisiin sitoutumisiin, ja vastaavasti liian korkea osuus immuunivasteen aktivoitumiseen.^{31,32} siRNA:n rakenteessa tärkeää on kaksoisjuosteen oikeanlainen muodostuminen. Palindromeja tai toistuvia sekvenssejä tulisi välttää, sillä ne voivat johtaa vaihtoehtoisten sekundäärirakenteiden muodostumisiin.³² Asymmetrinen nukleotidisisältö ja heikko emäspariutuminen juosteen 5'-päässä varmistaa sen, että haluttu antisense-juoste pääsee suotuisammin vuorovaikuttamaan RISC-kompleksin kanssa. Tällöin esimerkiksi antisense-juosteen 5'-päässä tulisi käyttää enemmän A/U-emäspareja ja vastaavasti sense-juosteen 5'-päässä G/C-emäspareja.³² 3'-päässä käytettävät dTdT-lisäkkeet parantavat puolustusta kaksoisjuosteen RNAasiensyymivälitteistä hajotusta vastaan.^{32,33}

Pallonukleiinihappojen (käsitellään tarkemmin luvussa 1.5.1) kohdalla pitkälti sekvenssien samat toivotut ominaisuudet tulisi säilyä. Korkea G-pitoisuus pallonukleiinihapporakenteen oligonukleotidijuosteissa lisää pallonukleiinihappojen sisäänottoa ja siten niihin pakattujen oligonukleotidien kuljetusta soluun (suurempi vuorovaikutus solun reseptorien kanssa). Samalla korkea G-pitoisuus lisää tiheän proteiinikoronan muodostusta³⁴, joka indusoi makrofagien aktivaatiota ja immuunivasteen kehittymistä. T-rikkaat sekvenssit muodostavat

ohuemman proteiinikoronan, joka johtaa lievemmän immuunivasteen syntymiseen.³⁴ Sekvenssi pitää siis tarkkaan suunnitella *in vivo*-prosessoinnin ja annostelutavan mukaan.

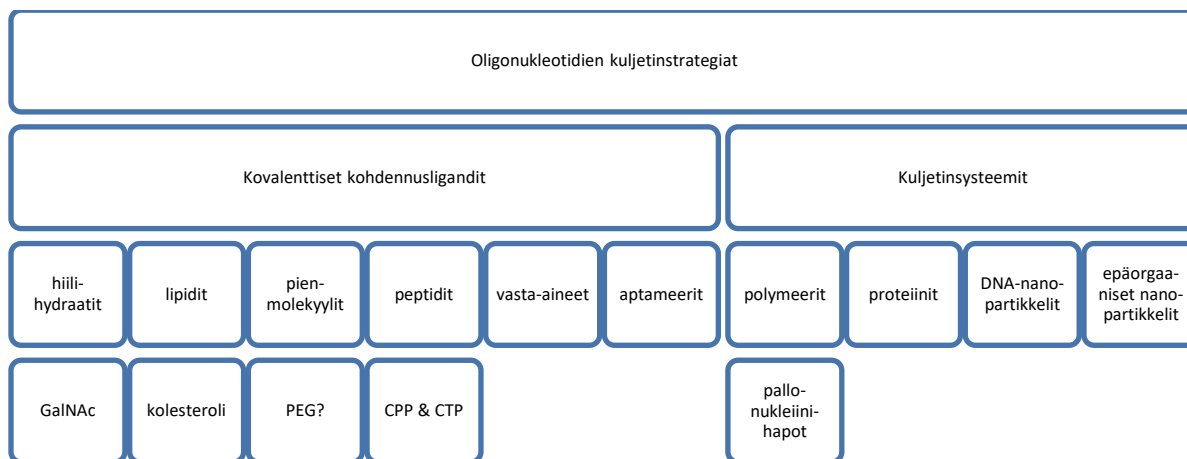
1.4 Nykyhaasteet siRNA-kuljetuksessa

Edellisessä luvussa käytiin läpi vapaiden oligonukleotidien erilaisia muokkausmahdollisuuksia, joilla ehostetaan oligonukleotidin toimintaa kohdekudoksessa ja -solussa. Haasteet kohteeseen pääsyn ja solun sisäisen kuljetuksen kanssa ovat kuitenkin siRNA-tutkimuksen suurimpia pullonkauloja. siRNA-molekyylit ovat kokonsa (pituus n.7–8 nm ja massa n. 13 kDa²) puolesta tarpeeksi pieniä munuaisten suodatettavaksi, mutta samalla liian suuria vapaaseen solun sisäänottoon. Kemiallisesti muokkaamattomat siRNA-molekyylit ovat hydrofiilisinä ja anionisina rakenteina alttiita mm. RNAasien hajotukselle fysiologisessa ympäristössä, joten niiden puoliintumisaika elimistössä vaihtelee vain noin viidestä 30 minuuttiin kudoksen mukaan.^{35,36} Solun sisäänoton jälkeen lääkeaine päätyy solun endosomeihin ja edelleen lysosomeihin, josta sen pitää vapautua (engl. endosomal escape) tavalla tai toisella välttääkseen alhaisen pH:n aiheuttaman hajotuksen. Endosomaalisen vapautumisen jälkeen siRNA voi päätyä produktiivisen reitin kautta RISC-kompleksin muodostukseen ja geeninhiljennykseen, tai sitten ei-produktiivisen reitin kautta sitoutua solun stressigranuloihin tai muihin sytoplasmisiin rakenteisiin. Tällöin myös efektiivisen siRNA:n konsentraatio ja aktiivisuus vähenee. Todennäköisyys jälkimmäisen reitin valintaan kasvaa, kun solu itsessään kohtaa esimerkiksi oksidatiivista stressiä.²⁷

Edellä mainituista syistä siRNA-tutkimuksessa on havaittu haasteita *in vitro* & *in vivo*-ympäristöissä. Siksi esimerkiksi kohdennettua annostusta, esimerkiksi silmän lasiaisiinjektiota³⁷, on suosittu systeemisen annostelun sijaan. Kohdennetun menetelmän löydyttyä annostelua joudutaan kuitenkin toistamaan säännöllisesti, sillä siRNA:n vaikutus on suhteellisen lyhytaikainen (päivistä viikkoihin). Silmäsairauksien ja RNA-lääkkeiden tutkimuksessa korostuu ihanteellisen kohteen identifioinnin tärkeys, eikä kaiken kattavaa ratkaisua ole realistista saavuttaa.⁵

1.5 Oligonukleotidien kuljetinstrategiat

Oligonukleotidien kuljetinstrategiat voidaan jakaa kahteen kategoriaan: kovalenttisiin kohdennusligandeihin sekä erilaisiin kuljetussysteemeihin mukaan lukien epäorgaaniset, lipidiset, polymeeriset ja muunlaiset kantajasyteemit, jotka tehostavat siRNA:n suojausta, solun sisäänottoa ja solunsisäistä prosessointia (kaavio 2).³⁸



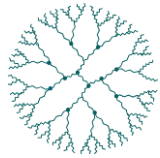
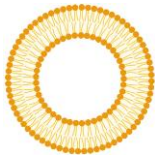

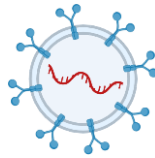
Kaavio 2: Erilaisia oligonukleotidien kuljetinstrategioita

Kovalenttisia kohdennusligandeja ovat esimerkiksi hiilihydraatit, lipidit, peptidit ja muut pienmolekyylit, joiden avulla lääkeaine kohdentuu ja kulkeutuu reseptorivälitteisesti kohdesoluun. Hiilihydraatit ovat yleisimpiä nykytutkimuksissa käytettyjä kohdennusligandeja, joista *N*-asetyyliagalaktosamiini (GalNAc) korostuu käytetyimpänä³⁹. GalNAc sitoutuu maksan solujen reseptoreihin ja edesauttaa lääkeaineen nopeaa solun sisäänottoa⁴⁰, mutta samalla pidentäen aikaa endolysosomaalisessa systeemissä. Tämän takia oligonukleotidien vapautuminen solulimaan voi tapahtua tasaisesti ja pidemmällä aikavälillä, jopa 6 kuukauden ajan *in vivo*³⁹. Lipidikonjugaateista käytetyin on kolesteroli. Kolesterolin avulla lääkeaineen kiertoaikaa elimistössä saadaan pidennettyä sen sitoutuessa veren lipoproteiineihin ja sitä kautta maksasoluihin. Polyetyleeniglykoli (PEG) on paljon hyödynnetty konjugaatti, joka vähentää seerumin proteiinien adsorptiota oligonukleotidin pinnalle ja estää sitä kautta mahdollisen proteiinikoronan muodostuksen. PEGyloitu nanopartikkeli muuttuu immuunijärjestelmälle huomaamattomaksi estäen retikuloendoteelisysteemin reseptoreja tunnistamasta oligonukleotidiä, jolloin sen kiertoaika elimistössä pitkittyy. PEGylointi tällöin vähentää ennen aikaista solun sisäänottoa, ja samalla mahdollistaa rakenteen pääsyn lopulliseen kohteeseensa *in vivo* (annostelu siis määrittää vahvasti PEGyloinnin hyödyt ja haitat)^{41–43}. Peptidikonjugaatteja on kahdenlaisia, solun läpäiseviä (engl. cell penetrating peptides, CPP) ja solua kohdistavia (engl. cell targeting peptides, CTP). CPP:t kulkevat solukalvon läpi mahdollisen oligonukleotidilastin kanssa, kun taas CTP:t kohdistuvat sairaudessa yliekspressoituun reseptoriin ja kohdentuvat sitä kautta oikeaan soluun.⁴⁴ Myös aptameerejä voidaan käyttää kohdennusligandeina⁴⁵.

Ihannetilanteessa erilaiset kuljetinsysteemit tehostavat oligonukleotidin fysiologista stabiilisuutta, pidentävät kiertoaikaa verenkierrrossa, mahdollistavat solun sisäänoton ja

endosomaalisen vapautumisen, hajoavat solulimassa vapauttaakseen oligonukleotidilastin ja tehostavat terapeuttista vaikutusta. Erilaisia oligonukleotidien kuljetinsysteemejä vertaillaan taulukossa 3. Viraaliset vektorit ovat myös mahdollisia kuljetinsysteemejä, mutta niiden immunogeenisyyden, korkeiden tuotantokustannusten ja alhaisen pakkauskapasiteetin takia motivoivat muiden mahdollisten systeemien tutkimusta, eikä niihin siten tässä tutkielmassa keskitytä.^{5,41,46}

Taulukko 3: Ominaisuuksia eri oligonukleotidien kuljetinsysteemeistä, mukailtu Ramasamy ym.³⁸, kuvat Biorender.com

Esimerkki				
Luokittelu	Polymeeriset misellit, polymeeriset nanopartikkelit, dendriimerit, polymerosomit, nanopallot (engl. nanosphere)	Liposomit, lipidinano-partikkelit, emulsiot, kiinteät lipidipartikkelit	Huokoiset silikananopartikkelit, kvanttipisteet, kulta-, rautaoksidi- ja hopeanano-partikkelit, hiilinanoputket	Bio-inspiroidut nanopartikkelit, biokonjugaatit, DNA-/RNA-pohjaiset nanopartikkelit, eksosomit
Hyödyt	Helppo muokkaus, partikkeliominaisuuksien tarkka hallinta, alhaiset tuotantokustannukset	Formulaatioiden yksinkertaisuus, bioyhteensopiva, biohajoavaisuus, helppo ligandikonjugointi	Teranostiset sovellutukset, laaja valikoima materiaaleja, kokoja ja rakenteita, hyvät sähköiset, magneettiset ja optiset ominaisuudet	Bioyhteensopiva, alhainen myrkyllisyys, korkea spesifisyys, alhainen immuunivaste
Haitat	Mahdollinen aggregaatio ja myrkyllisyys	Rajattu stabiilisuus, alhainen pakkaus-tehokkuus	Huono liukoisuus, stabilaatiotarve myrkyllisyys	Rajattu stabiilisuus, korkeat tuotanto-kustannukset

1.5.1 Pallonukleiinihapot oligonukleotidien kuljettimina

Pallonukleiinihapot (engl. spherical nucleic acids, SNA) ovat DNA- tai RNA-pohjaisia nanopartikkeleita, jotka koostuvat ydinrakenteesta, linkkeristä ja muokattavasta tunnistusalueesta (sekvenssispesifinen oligonukleotidi). siRNA-terapiassa pallonukleiinihapon toiminnalliseen tunnistusosaan on hybridisoitu sense-juoste (vs. diagnostiikassa toiminnallinen osa jätetään yksijuosteiseksi tunnistusta varten). Toiminnalliseen osaan voidaan myös kiinnittää leima jatkotutkimuksia varten.⁴⁷

Pallonukleiinihappojen rakenteesta stabiilin tekee tiheästi asetetut anioniset oligonukleotidijuosteet yhdessä polykationisen ydinrakenteen kanssa. Järjestäytynyt tiheä rakenne lisää vastustusta elimistön nukleaaseille. Oligonukleotidien luoma tiheä pintavaraus lisää myös kationisten suolojen sitoutumista rakenteen pinnalle, mikä onkin suurin syy nukleasiaktiivisuuden hiljentämiselle. Pallonukleiinihapot ovat myös vähemmän immunogeenisiä kuin niitä vastaavat vapaat siRNA-juosteet. Niiden on myös väitetty pääsevän kulkeutumaan elimistön rajapintojen, kuten aivoveriesteen, läpi.^{41,48}

RNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen nukleaasien vastaiseen stabiilisuuteen on todettu vaikuttavan neljä eri parametria: sekvenssi, linkkeri, tiheys ja pinnan rakenne (engl. backfilling). Barnaby ym. totesivat tutkimuksessaan, että RNAasiin tunnistamat sekvenssialueet (esimerkiksi AU/UA) lähellä ydinrakennetta onnistuttiin hajottamaan entsyymaattisesti, vaikka pallonukleiinihapon oligonukleotiditiheys oli suuri. Jäykkien linkkereiden (esim. poly-T) todettiin hidastavan entsyymaattista hajotusta verrattuna joustavimpiin (esim. heksaetylenei), jotka sallivat oligonukleotidien siirtyvän kauemmas ydinrakenteesta. Huomattiin myös, että vaikka DNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen kohdalla yksi- tai kaksijuosteisuus ei vaikuttanut nukleasistabiilisuuteen, RNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen kohdalla kaksijuosteisuuden huomattiin tehostavan stabiilisuutta. Oligonukleotidijuosteiden joukkoon sijoitetut PEG-ketjut vähensivät entsyymien pääsyä rakenteeseen ja siten pidensi merkittävästi RNA-pohjaisten pallonukleiinihappojen puoliintumisaikaa.⁴⁹

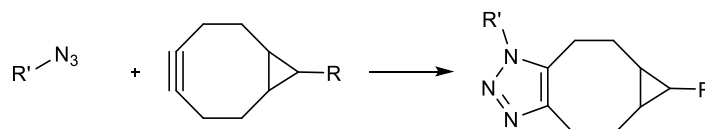
Ydinrakenteen valinnalla voidaan vaikuttaa paljon pallonukleiinihappojen ominaisuuksiin, kuten oligonukleotiditiheyteen ja funktionalisaatioreaktion olosuhteisiin. Vaikka pallonukleiinihappojen yleisin ydinrakenne on kultananopartikkeli, orgaaniset ja biohyhteensopivat ydinrakenteet (kuten liposomit, piidioksidirakenteet jne.) ovat osoittautuneet sopivammiksi *in vivo*-sovellutuksia ajatellen. Myös ydinrakenteen koko vaikuttaa suoraan pallonukleiinihapon kokoon, ja sitä kautta solun sisäänottoon ja rakenteen toiminnallisuuteen.⁴¹ Pallonukleiinihappojen rahti-kantaja-massasuhteen on todettu olevan käänteisesti riippuvainen ydinrakenteen koon kanssa⁵⁰. Pienten, halkaisijaltaan alle 20 nm kokoisten kultananopartikkeleista valmistettujen pallonukleiinihappojen on todettu kykenevän pakkaavan suurempia määriä oligonukleotidirahtia suurempikokoisiin ydinrakenteisiin verrattuna, enimmäkseen voimakkaamman kaarevuuden ansiosta (luonnollisesti laajempi kaarevuussäde=enemmän tilaa jokaisen oligonukleotidin ympärillä)⁵¹. Pallomaisten ydinrakenteiden on todettu samasta syystä pakkaavan suurempia oligonukleotidimääriä

litteämpiin rakenteisiin verrattuna. Myös suolapitoisuutta (NaCl) nostamalla on saatu tehostettua ydinrakenteiden pakkauskapasiteettia⁵¹.

Buckminster-C60-fullereenia käytettiin pallonukleiinihappojen ydinrakenteena HER2-geenin kohdennuksessa. Gulumkar ym. totesivat rintasyöpäsolumalli MCF7:n tutkimuksellaan, että C60-SNA otettiin solun sisään noin 500-kertaisesti paremmin vapaaseen oligonukleotidiin verrattuna.⁵² Piioksididydiin on muihin ydinrakenteisiin verrattuna bioyhteensopivampi, stabiilimpi, helposti syntetisoitava ja pintamuokattava, vaikka onkin joissain tutkimuksissa osoittanut indusoivan soluissa oksidatiivista stressiä^{53,54}. Piidioksididydirakenteita voidaan valmistaa mm. päällystämällä kultananopartikkeli piidioksidilla, kiinnittämällä oligonukleotidit kuoreen ja lopuksi poistamalla kultananopartikkeli oksidatiivisella liuotuksella jodin avulla (engl. oxidative dissolution)⁵⁵. Muita yleisiä SNA-ydinrakenteita ovat esimerkiksi liposomit, kvanttipisteet, hopeananopartikkelit ja erilaiset polymeerit.⁴¹ Lipidi- ja polymeeripohjaiset (esimerkiksi poly(maitoglykoli)happo, engl. polylactic glycolic acid, PLGA) nanopartikkelit aiheuttavat vähiten myrkyllisiä sivuvaikutuksia, ja ovat siten FDA-hyväksytyjä kliinisiä tutkimuksia varten⁵⁶. Pallonukleiinihappojen negatiivisen pintavarauksen ja muiden ominaisuuksien ansiosta niitä kuitenkin yleisesti pidetään turvallisina molekyyleinä^{43,57}.

Pallonukleiinihappojen väliset erot koostumuksissa (ydinrakenteen koon ja kiinnittyneiden oligonukleotidien määrän vaihtelu) vaikeuttaa niiden rakenteen ja toiminnan välistä tutkimista. Li ym. kehittivät molekulaariset pallonukleiinihapot (molecular spherical nucleic acids, MSNA), jotka hyödyntävät ydinrakenteita, joihin kiinnittyvien oligonukleotidijuosteiden määrä olisi aina sama. Juosteita tulisi olla ydinrakenteessa tarpeeksi vähän, jotta erilaiset SNA:t voidaan erottaa toisistaan, mutta tarpeeksi paljon, jotta pallonukleiinihappojen hyödyt vapaisiin oligonukleotideihin verrattuna säilyisivät. Lopulta Li ryhmineen valmistivat kaksi erilaista ydinrakennetta: C60-fullereenin 12:lla atsidilinkkerillä ja silseskvioksaanin (cubic oligomeric silsesquioxane, COSS) 8:lla atsidilinkkerillä. Dibentosyklo-oktyynillä (DBCO) muokatut antisense-DNA-juosteet kiinnitettiin ydinrakenteiden atsidiryhmiin vesiliuoksessa. Valmistettuja pallonukleiinihappoja vertailtiin paljaaseen antisense-DNA:han pysyvyyden, solun sisäänoton ja geenihiljennyksen suhteen. Kokeissa molemmat pallonukleiinihapot kulkeutuivat MCF7-rintasyöpäsoluihin vapaata oligonukleotidia tehokkaammin, C60-fullereeni kuitenkin kaikista parhaiten. C60-SNA myös hiljensi kohdegeeni HER2:n ilmennystä huomattavasti enemmän (81 %) verrattuna COSS-SNA:han (15 %).⁵⁸

Kuparikatalysoitua alkyyni-atsidi-napsautuskemiaa on käytetty oligonukleotidien kiinnitykseen rautaoksiditymiiniin⁵⁹. Turun yliopistossa on hyödynnetty kuparivapaata napsautuskemiaa, tarkemmin ottaen rengasjännitteen tehostamaa alkyyni-atsidi sykloadditiota (engl. strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC) hallitusti funktionalisoituja pallonukleiinihappoja valmistettaessa. Kaksivaiheisen SPAAC-kokoamismenetelmän avulla ensin yksi erillinen käsivarsi voidaan liittää ydinrakenteeseen ennen muun rakenteen kokoamista. Hallittu konjugaatio perustuu muodostuvan reaktiotuotteen liukoisuusominaisuuksien muutokseen. Monofunktionalisaatio tehdään dimetyylisulfoksidissa (engl. dimethyl sulfoxide, DMSO), jossa ydinrakenteen ja negatiivisesti varautuneen hydrofiilisen oligonukleotidin välinen elektrostaattinen repulsio ehkäisee tuotteen reagoimista edelleen. Loput käsivarret kiinnitetään ydinrakenteeseen vesiliuoksessa, johon myös hydrofiilisemmäksi muuttunut monofunktionalisoitu tuote liukenee.⁵²



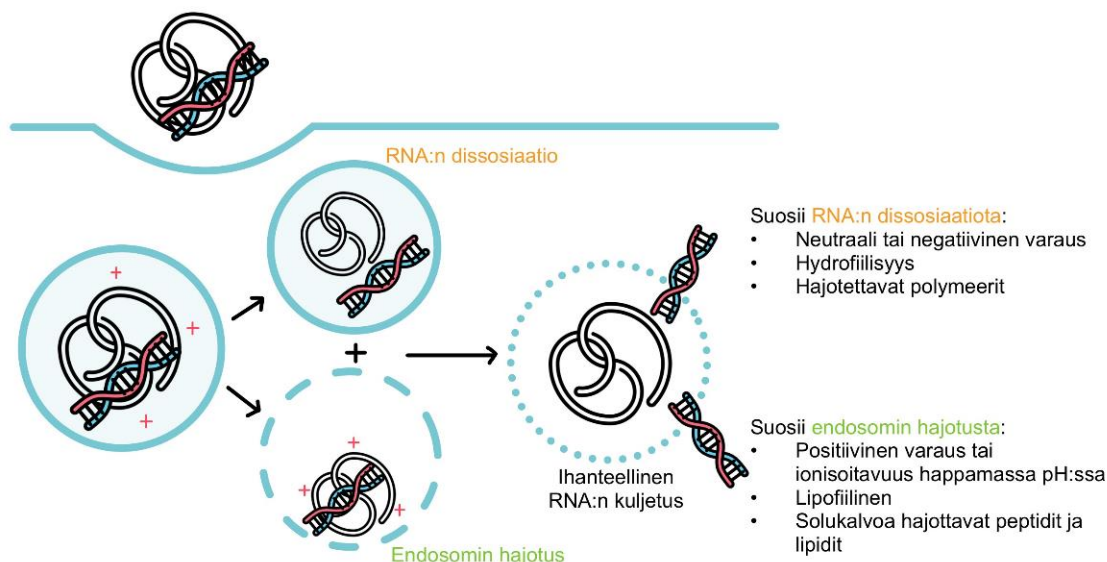
Kaavio 3: SPAAC-reaktio

Yleisesti nanokantajien endosytoosin tiedetään perustuvan pääosin pintarakenteen kationiseen varaukseen, ja elektrostaattisten voimien kautta tapahtuvaan vapaaseen kulkeutumiseen solukalvon läpi. Pallonukleiinihapot kulkeutuvat oligonukleotidikuorensa ansiosta aktiivisesti solukalvon läpi luontaisesti solun pinnalla olevien Scavenger-reseptorien kautta.⁴¹ Scavenger-reseptorit ovat polyanionisia ligandeja tunnistavia hahmontunnistajia. Pallonukleiinihappojen tiheä oligonukleotidikuori matkii reseptorien luonnollisia polyoligonukleotidiligandeja ja siten mahdollistaa aktiivisen kuljetuksen soluun. Scavenger-reseptorien lisäksi pallonukleiinihappoilla on korkea affiniteetti systeemissä ympäristössä läsnä oleviin plasman proteiineihin. Proteiinikoronan muodostus pallonukleiinihapon pinnalle on siis kilpaileva reaktio aktiivisen endosytoosin kanssa, joka voi vaikuttaa negatiivisesti pallonukleiinihappojen sisäänottoon ja sitä kautta niiden toiminnallisuuteen.^{60,61} PEGyloinnin on todettu lisäävän vapaiden oligonukleotidien positiivisia ominaisuuksia, mutta liian tiheä PEG-pitoisuus RNA-SNA:n pinnalla voi vaikeuttaa solun sisäänottoa⁶².

Pallonukleiinihappojen solun sisäisestä prosessoinnista on toistaiseksi vain vähän tietoa. Wu ym. tutkivat solunsisäistä reittiä hiiren endoteelisolulinja C166:lla. Tutkimuksessa havaittiin, että päädyttyään solun sisälle, rakenteet säilyvät myöhäisissä endosomeissa 16–24:n tunnin ajan. Tämän aikana oligonukleotidijuosteet hajoavat ja irtoavat ydinrakenteesta DNAasi 2-

entsyymivälitteisesti. Hajotetut oligonukleotidit kuljetetaan lopulta ulos solusta, ydinrakenteen säilyessä myöhäisessä endosomissa. Tutkimuksen aikana ei havaittu pallonukleiinihappojen kulkeutumista lysosomeihin, ja vain pieni osa pallonukleiinihappoihin kiinnitetyistä oligonukleotideista osallistui geeniekspression säätelyyn. Tutkimus korosti täten tarvetta muokata pallonukleiinihappoja niin, että endosomaalista vapautumista ja saatavuutta solulimassa kasvatetaan.⁶³ Park ym. hyödynsivät univalentin NaCl-suolan sijaan divalenttia CaCl₂-suolaa SNA-synteesin aikana tehostaakseen pallonukleiinihappojen solulimakuljetusta ja endosomaalista vapautumista. Kalsium osallistuu vahvasti solun ionikanavien toimintaan sekä geeniekspression, jolloin sen pitoisuutta solun eri rakenteissa säädellään tarkasti. Siten, kunhan kalsium-SNA-kompleksi saataisiin pysymään koossa fysiologisissa olosuhteissa, SNA:n kulkeutuminen solun koneiston läpi olisi kalsiumpitoisuuden ohjaamaa. Todettiin, että suolan vaihto synteesin aikana tehosti solun sisäänottoa jopa 36-kertaisesti, solulimakuljetusta 22 %:lla ja geeninsäätelyaktiivisuutta 20-kertaisesti siRNA-rakenteilla. Ca²⁺-ionien todettiin pysyvän yhdistettyinä SNA-rakenteisiin jopa fysiologisissa olosuhteissa. Tämän ansiosta SNA-rakenteen päätyminen endosomeihin aiheuttaa kalsiumionien konsentraatiogradientin endosomin ja soluliman välillä, ja johtaa lopulta endosomin hajoamiseen ja SNA:n vapautumiseen.⁶⁴ Pallonukleiinihappojen synteesimenetelmä vaikuttaa kuitenkin suuresti siihen, säilyykö käytettävä suola lopputuotteessa *in vitro*-käyttöön asti vai puhdistetaanko se lopputuotteesta pois ennen jatkokäyttöä. Siksi synteesissä käytetyn suolan vaikutuksen lopputuotteen käyttäytymiseen jatkotutkimuksessa voisi odottaa olevan suhteellisen pieni verrattuna lopputuotteen kiinteämpiin ominaisuuksiin.

Lopullinen RNA-transfektio vaatii toimiakseen endosomaalisen vapautumisen lisäksi myös tehokkaan RNA:n vapautumisen kantajaltaan oikeissa olosuhteissa (kaavio 4). Erilaisia polymeeri-nanokantajia, kuten pH-, valo-, entsyymi- ja redox-riippuvaisia polymeerejä, on tutkittu. Tämän kaltaisten polymeerien halutussa ympäristössä indusoitava RNA-vapautus varmistaisi lastin pääsyn kohteeseen asti.⁶⁵



Kaavio 4: Ominaisuuksia, jotka vaikuttavat RNA:n dissosiaatioon kantajasta ja endosomin hajotukseen, mukailtu lähteestä Cheung ym.⁶⁵

siRNA-pallonukleinihappoja tutkittaessa nousi esiin myös kysymys siitä, säilyykö geenihiljennyksen mekanismi samana kuin luonnollisella, vapaalla siRNA:lla vai vaatiiko RNAi-mekanismi toimiakseen siRNA:n irrotuksen ydinrakenteesta. Havaittiin, että mekanismi vaatii toimiakseen siRNA:n irrotuksen, jonka jälkeen RNAi-reitti vastaa luonnollista mekanismia. Dicer-2-ribonukleasin ja Loquaciouksen muodostaman kompleksin huomattiin irrottavan kaksijuosteiset siRNA:t SNA:n pinnalta, jonka jälkeen mekanismi etenee aikaisemmin esitettyä reittiä pitkin.⁶⁶

Lukuisia siRNA-SNA-tutkimuksia on tehty niin syöpäsairauksien kuin ihotautien saralta⁴³. Tässä tutkielmassa kuitenkin keskitytään silmäsairauksien hoitoon. Mirkin ryhmineen kehitti liposomi-ytimellisen VEGF-pallonukleinihapporakenteen hiusneula-siRNA:lla perinteisen kultananopartikkeliytimellisen rakenteen lisäksi. Hiusneula-siRNA:n avulla antisense – ja sense-juosteet olivat kiinni toisissaan kovalenttisesti hybridisaation sijaan. Kultananopartikkelin korvaaminen liposomaalisella ydinrakenteella vähensi siRNA-pallonukleinihappojen sytotoksisuutta ihmisen napanuoran verisuonten endoteelisolulinjan (engl. human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) soluissa noin neljännekseen. Pallonukleinihappojen solun sisäänotto oli myös moninkertaista verrattuna vapaan oligonukleotidin sisäänottoon. Sisäänottoa seurattiin virtaussytometrisesti lineaariseen oligonukleotidiin kiinnitetyn Cy5-fluoreskeiiniileiman avulla. VEGF-geenin ilmennyksen hiljennys testattiin 24 h ja 48 h käsitellyillä HUVEC-soluilla. Näytteet kuvattiin valomikroskooppisesti ja kuvien verisuonten uudissuonittuminen määritettiin soveltuvalla ohjelmistolla. VEGF-hiljennyksen määritettiin olevan kontrolliin verrattuna noin

nelinkertaista.⁶⁷ Efektiivinen oligonukleotidikonsentraatio näytteissä oli 100 nM ja tutkimuksessa mitattiin 4 ja 24 tunnin aikapisteet. Saaduissa kuvissa hiljennetyt solunäytteet pysyivät palloina eikä uudissuonitusta havaittu (VEGF hiljennetty). Kontrollinäytteissä havaittiin putkimaisia rakenteita solujen välillä, mikä viittaisi uudissuonten muodostumiseen. Saadut tulokset nojaavat kuitenkin vain näytteiden silmämääräiseen tarkasteluun, eikä yksiselitteisiä tuloksia geenihiljennyksestä esimerkiksi kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion (engl. quantitative polymerase chain reaction, qPCR) kautta ole saatavilla.

1.6 Silmänpohjan ikärappeuma ja ARPE-19-solumalli

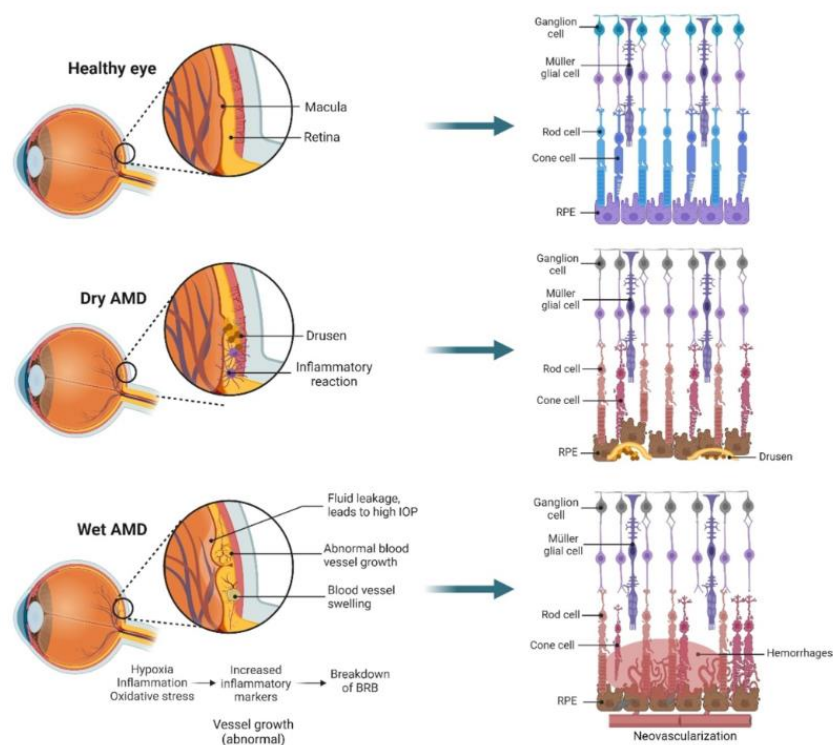
Silmänpohjan ikärappeuma (engl. Age-Related Macular Degeneration, AMD) on maailmassa yleisin näön menetystä aiheuttava sairaus, joka vaikuttaa kansainvälisesti yli 200 miljoonan henkilön elämään. Pääosin sairaus esiintyy yli 60-vuotiailla ihmisillä. AMD vaikuttaa pääosin silmän ulkoiseen verkkokalvoon, johon lukeutuu verkkokalvon pigmenttiepiteeli (engl. retinal pigment epithelium, RPE), Bruchin kalvo (engl. Bruch membrane) ja suonikalvo sen kapillaarikerroksineen (engl. choroid, lat. choriocapillaris) (kaavio 5).⁶⁸



Kaavio 5: Silmän verkkokalvon terveet rakenteet (Biorender)

AMD voidaan jakaa (kaavio 6) kuivaan eli ei-neovaskulaariseen (engl. dry AMD) ja märkään eli neovaskulaariseen (engl. wet/neovascular AMD) alatyyppeihin. Edellä mainituista kuiva AMD on yleisempi, ja sitä esiintyy 80–85 % AMD-tapauksista. Kuivan AMD:n määritelmiin kuuluu ”drusen”-nimiset kellertävät alueet silmän verkkokalvon ja RPE:n välissä. Kuivan AMD:n

ennustetta pidetään myös suotuisampana verrattuna neovaskulaariseen AMD:hen. Kuiva AMD voi kehittyä edelleen 10–15 %:n todennäköisyydellä. Neovaskulaarinen AMD on yleisin edenneen AMD:n muoto, ja sitä esiintyy 15–20 %:lla tapauksista. Neovaskulaarisen AMD:n määritelmänä toimii epänormaali angiogeneesi eli verisuonten muodostuminen verkkokalvon sisimmille kerroksille. Angiogeneesin myötä verisuonet voivat vuotaa verkkokalvon rakenteisiin ja siten aiheuttaa pysyvää näön menetystä ilman hoitoa. Sairauden etenemiseen neovaskulaarisen AMD:n kohdalla vaikuttaa myös potilaan verta ohentavien lääkkeiden, kuten aspiriinin, klopidogreelin ja varfariinin, käyttö, sillä ne kohottavat riskiä muodostuneiden verisuonten vuodoille. Verisuonten endoteelin kasvutekijän (engl. vascular endothelial growth factor, lyh. VEGF) tiettyjen alatyypin epätyypillisen korkean ekspresion on havaittu vaikuttavan merkittävästi sairauden etenemiseen. VEGF ohjaa elimistössä normaalia angiogeneesiä, mutta AMD:n alkuvaiheen hypoksinen ympäristö voi ohjata sen yliekspressoitumiseen, jolloin verisuonia alkaa muodostumaan myös verkkokalvon kerroksille, haitaten näköaistia.⁶⁸



Kaavio 6: Terveen ja rappeutuneen silmän rakenteet ja eri piirteet. Copyright⁵

Toistaiseksi AMD:lle ei ole olemassa parantavaa hoitoa, vaan sairauden etenemistä pyritään hidastamaan. Yleisimpänä hoitokeinona AMD:tä vastaan toimii lasiais-(intravitreaaliset) injektiot, jossa haluttu lääke saadaan luotettavasti ja tarkasti annosteltua kohdekudokseen. Neovaskulaarisen AMD:n yleisimpänä hoitona annetaan vasta-aine anti-VEGF-injektioita

(markkinoille hyväksytty aflibercept ja ranibizumab) säännöllisin väliajoin, jotta uudissuonten syntymistä eli angiogeneesiä saadaan hillittyä.⁶⁸

Silmän rakenteet ja kudokset, toisin kuin muut keskushermoston kudokset, ovat kliinisesti helpommin saavutettavissa. Täten siis siRNA:n annostelu suoraan kohdekudokseen on helpompaa, jolloin vältetään myös systeemisen annostelun hankaluudet ja mahdolliset myrkylliset vaikutukset. Silmän immuunijärjestelmä on myös muuta elimistöä heikompi. Silmän rakenteista lasiaisessa, etukammiossa ja suonikalvossa tapahtuvat anatomiset ja biokemialliset prosessit varmistavat silmän ”immuuniedun” (immune privilege)⁶⁹. Muun muassa piipohjaisia⁷⁰ kuljetusmenetelmiä on kehitetty, jotta lääkkeiden sarveiskalvon läpäisevyys tehostuisi (noin 10 % annostellusta lääkkeestä²⁵ pääsee oikeasti perille silmään johtuen sarveiskalvon, kyynelten jne. aiheuttamasta fysikaalisesta esteestä). Lääkkeiden injektio lasiaiseen on tehokkain tapa viedä lääkeaineet mahdollisimman lähelle silmän takaosaa (ohittaen fysikaaliset esteet), vaikka riskinä olisikin injektion aiheuttamat verikudoksen vahingot ja systeeminen immuunireaktio^{71,72}.

Erilaistuneet RPE-solut vastaavat fysiologisesti parhaiten veri-verkkokalvoesteen muodostavia pitkälle erilaistuneita verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluja. Ihmisestä eristetyt ARPE-19-solulinjan solut ovat helppokäyttöinen ja edullinen malli siRNA:n alustavalle testaukselle. Solumallissa toimiviksi osoitetut siRNA-kuljettimet vaativat kuitenkin mittavaa tutkimusta myös *in vivo*-malleissa, jotta tuloksista saadaan luotettavampi kokonaiskuva.⁷³ ARPE-19-soluissa ”housekeeping”-geeni glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi (engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) on yleisesti esiintyvä muissakin solulinjoissa. GAPDH:ta esiintyy eniten korkean metabolian soluissa (syöpä- ja kantasolut) suuremman energiatarpeen takia. GAPDH vaikuttaa solussa keskeisesti muun muassa oksidatiivisessa fosforylaatioissa tuottaen solulle elintärkeää energiaa ja osallistuu myös antimikrobiaaliseen puolustukseen sekä mRNA:n stabiiliuden hallintaan. GAPDH toimii siRNA-tutkimuksessa usein kontrolligeeninä, sillä geenin hiljennyksen vaikutukset näkyvät nopeasti solujen elävyydessä ja muiden biologisten ominaisuuksien muutoksissa.⁷⁴

1.7 Yhteenveto ja työn tarkoitus

siRNA-pohjaiset lääkkeet tarjoavat entistä kohdennetumpaa hoitoa sekä harvinaisille, että väestössä yleistyneille sairauksille. siRNA-lääkkeet ovat laajasti tuotettavissa alhaisemmilla kustannuksilla esimerkiksi vasta-aineisiin verrattuna. Haasteina siRNA-lääkkeillä on kuitenkin huono vapaa kulkeutuminen kohdekudokseen ja -soluun. Nanopartikkelisilla kuljettimilla

voidaan parantaa siRNA:n pysyvyyttä elimistön nukleaaseja vastaan ja parantaa kuljetinominaisuuksia kantajan erinäisillä muokkausmahdollisuuksilla. Pallonukleiinihapot tarjoavat kehitysmahdollisuuksia bioyhteensopiville nanokantajille, joiden avulla myös kertaannosta soluun saadaan kasvatettua.

Silmänpohjan ikärappeumalle ei ole toistaiseksi olemassa parantavaa hoitoa. AMD on väestössä yleinen sairaus, ja on edetessään yksi suurimmista sokeutta aiheuttavista sairauksista. Vasta-ainepohjaiset lääkkeet ovat vakiintuneet yleisimmiksi AMD-hoidoiksi niiden korkeamman tehokkuuden ja pidemmän vaikutusajan takia. siRNA-lääkkeiden tutkimus silmäsairauksissa on saanut jalansijaa tutkimuksen saralla, vaikkakin päähuomio on edelleen systeemisesti annosteltavissa maksa- ja munuaislääkkeissä.

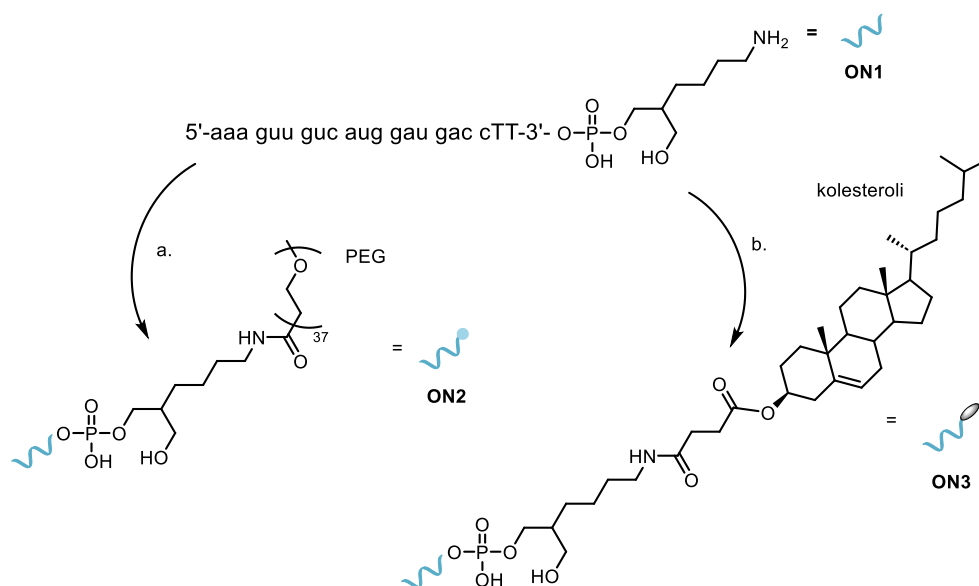
Pallonukleiinihapot ovat uudenlainen nanokantajien luokka, joiden omanlaatuinen rakenne tuo paljon mahdollisuuksia terapeuttisia käyttökohteita ajatellen. Ne pääsevät solun sisälle reseptorivälitteisesti ilman tranfektioaineita ja pystyvät ylittämään elimistön rajapintoja. Tutkimus siRNA:n, miRNA:n ja ASO:jen kuljetuksessa on vilkasta käsittäen eri käyttökohteissa syöpämalleista ihotauteihin. Proteiinikoronan muodostus ja bioyhteensopivimmat ydinrakenteet tuovat esiin tutkimuskysymyksiä, jotka vaativat lisätyötä ja vastauksia. Haasteita terapeuttisten vaikutusten tehokkuudessa siis on, mutta miltei rajattomat ydinrakente- ja oligonukleotidisekvenssit muokkauksineen voivat tuottaa tulevaisuudessa kliinisiin tutkimuksiin ja käyttöön soveltuvan formulaation. Pallonukleiinihapot voivat hyvinkin olla tulevaisuudessa yksi terapeuttisten oligonukleotidien ja/tai muiden lääkeaineiden kuljetinsysteemi. Anti-GAPDH-siRNA-MSNA:iden syntetisoimisella ja tutkimisella ARPE19-solumallissa saadaan arvokasta lisätietoa siRNA-lääkitsemisen mahdollisuuksista silmäsairauksien saralla.

2 Kokeelliset menetelmät

Reaktiotuotteiden massaspektrometrinen analyysi tehtiin Waters AQUITY RDa-massaspektrometrillä. Oligonukleotidikonsentraatiot määritettiin UV-spektrofotometrisesti 260 nm-aallonpituudella. Polyakrylamidigeelielektroforeesi (PAGE)-näytteet valmistettiin sekoittamalla 5 µl 0,1 µM tuotelaimennosta 1xPBS:ssä ja 3 µl TBE näytekupuria (Novex Hi-Density TBE Sample Buffer (5X), kat. LC6678). Ajoon käytettiin 6 % TBE-geeliä (ThermoFisher), kontrollinäytteenä DNA-tikapuu (GeneRuler 100 bp DNA ladder ready-to-use, ThermoFisher) ja ajopuskurina tris-boraatti-EDTA-puskurista (8,9 mM Tris, 8,9 mM boorihappo, 0,2 mM EDTA, pH 8,3) MilliQ-vedessä (laimennettu 10X TBE puskurista, ThermoFisher). Geeli ajettiin 30 min ajan 200 V jännitteellä ja 45 mA virralla, jonka jälkeen geeli värjättiin nukleinihappospesifisellä SYBR Gold-värillä (Invitrogen) ja kuvattiin geelikuvausjärjestelmä Syngeneillä ja GeneSys-ohjelmistolla.

2.1 Oligonukleotidisynteesit

2.1.1 Antisense-RNA



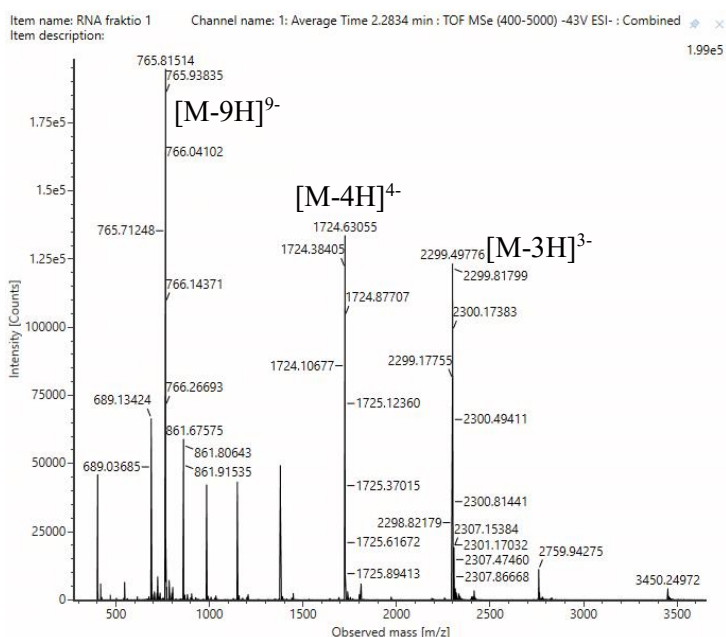
Kaavio 7: Antisense-oligonukleotidien synteesit. a) PEGylointi, b) kolesterolin konjugointi.

Antisense-RNA-oligonukleotidin **ON1** (sekvenssi 5'-AAA GUU GUC AUG GAU GAC C[*dT*][*dT*]-3') synteesiä varten tarvittavat fosforamidiitit punnittiin, kuivattiin eksikkaattorissa ja liuotettiin kuivaan asetonitriiliin. 3'-Amino-kantaja (Link Technologies, kat. LK2350-C001) punnittiin 3 µmol skaalan mukaisesti oligonukleotidisynteesikoloniin. Oligonukleotidin valmistukseen käytettiin ÄKTA oligopilot plus-syntetisaattoria. Ammonolyysi suoritettiin

oligonukleotidisynteesin jälkeen ammoniakkin (25 % vesiliuos) ja metyyliamiinin (40 % vesiliuos) (1:1, v/v) seoksessa huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Ammonolyysin jälkeen liuos erotettiin kantajasakasta suodattamalla erilliseen mikrosentrifugiputkeen ja haihdutettiin kuiviin silyyliin poistoa varten.

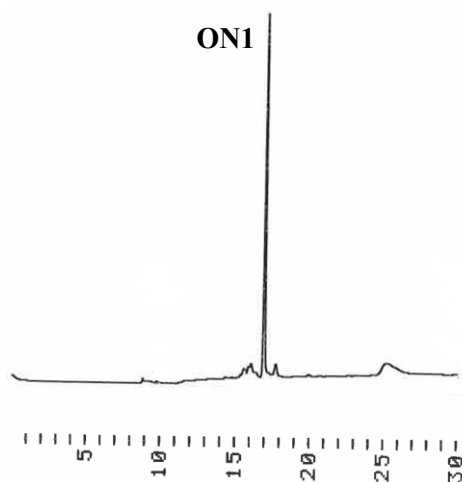
Raakatuoteelle suoritettiin silyyliin poistoon laadittu protokolla⁷⁵ 3 µmol skaalassa. Raakatuote liuotettiin 300 µl:aan kuivaa DMSO:a ja liuokseen lisättiin 375 µl trietyyliamiinitrihydrofluoridia. Reaktioon annettiin edetä 65 °C:ssa 2,5 tunnin ajan. Seuraavaksi hieman jäähtyneeseen reaktioseokseen lisättiin 75 µl 3 M natriumasetaatiliuosta nukleasivapaassa vedessä sekä 3 ml kylmää isopropanolia. Liuos sekoitettiin ja jäähdytettiin -20 °C:een 30 minuutiksi. Seosta sentrifugoitettiin 10 minuutin ajan 5000 g:ssä, jonka jälkeen supernatantti poistettiin. Pelletti huuhdeltiin isopropanolilla, jonka jälkeen sen annettiin kuivua vetokaapissa ennen liuottamista 1 ml nukleasivapaaseen veteen.

Tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 1). ESI-MS: $[M-3H]^{3-}$ m/z: 6901,5 (havaittu); 6903,0 (laskettu).



Kuva 1: Antisense-RNA:n ON1 raakatuotteen massaspektri

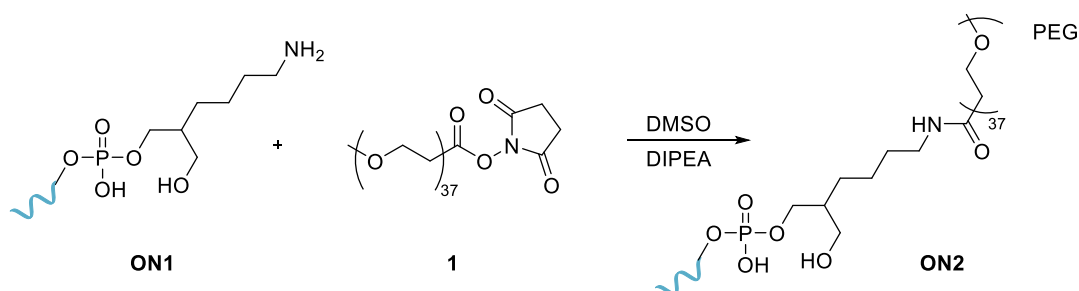
Raakatuote puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM-trietyyliammoniumasetatti (TEAA)-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitrilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 × 10 mm, 5 µm). Ajogradienttina oli 30 min 5–35 % ACN (kuva 2) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuivaksi.



Kuva 2: ON1 raakatuotteen HPLC-kromatogrammi

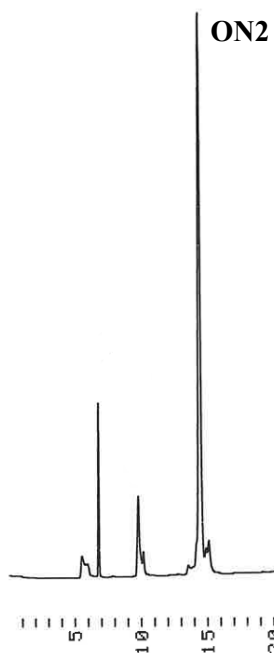
Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomääritystä UV-spektrofotometrisesti. Oligonukleotidisynteesin saannoksi määritettiin 1,1 μmol (37 %).

2.1.2 PEG-antisense RNA



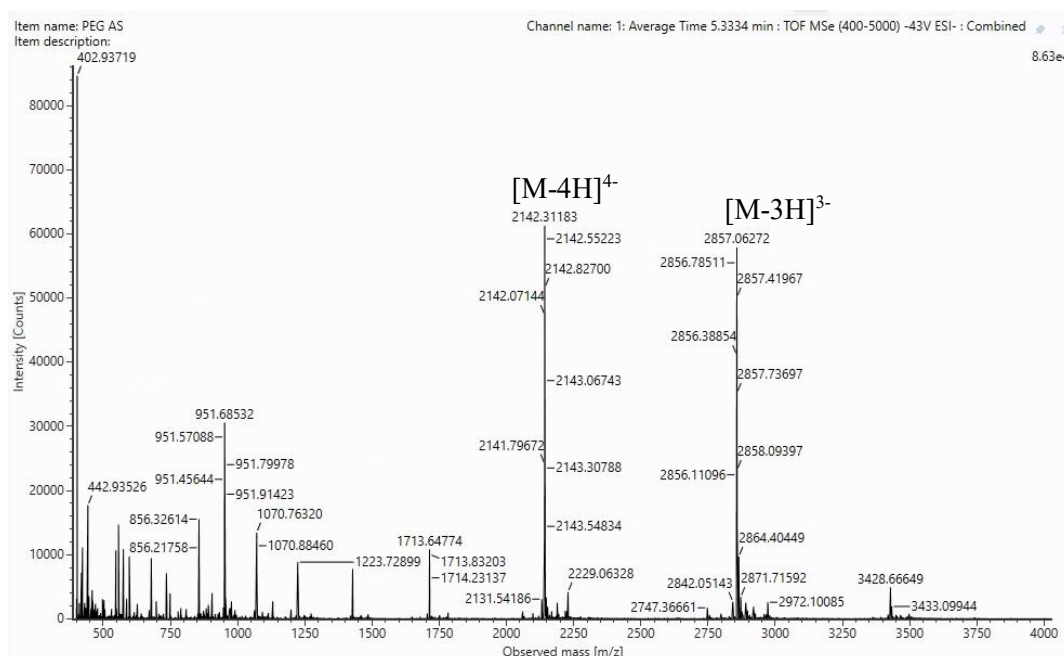
Kaavio 8: PEGyloidun oligonukleotidi ON2:n synteesi

ON1 (40 nmol) haihdutettiin kuiviin mikrosentrifugiputkeen, jonka jälkeen haihdutusjäännökseen lisättiin di-isopropyylietyyliamiiniliuosta (DIPEA) DMSO:ssa (800 nmol, 20 μl) sekä PEG-NHS esterä (kat. QBD-10910-100, Vector Laboratories) 1 DMSO:ssa (800 nmol, 20 μl). Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan, jonka jälkeen tuote puhdistettiin reaktiosta HPLC-kromatografisesti 50 mM-trietyyliammoniumasetaatti (TEAA)-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 x 10 mm, 5 μm). Ajogradienttina oli 20 min 5–50 % ACN (kuva 3) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot kuivattiin yön yli kylmäkuivurissa.



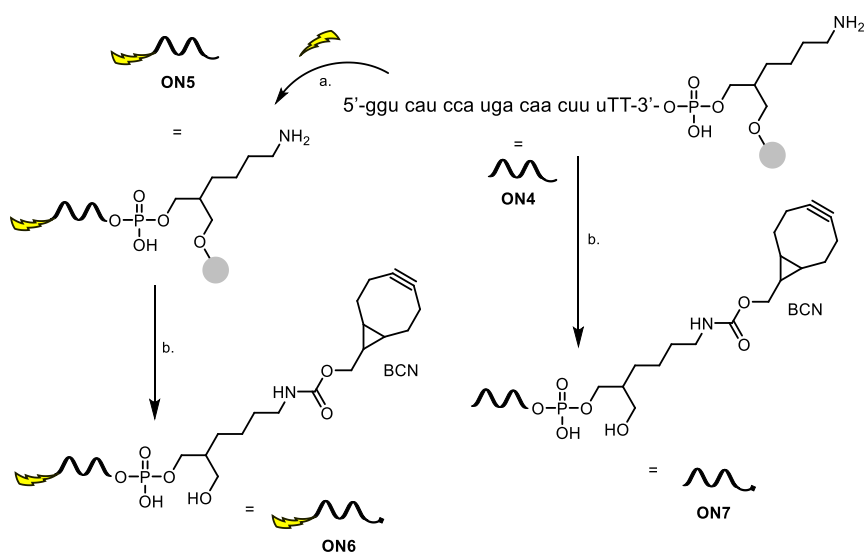
Kuva 3: PEGyloidun oligonukleotidin **ON2** HPLC-kromatogrammi

Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti. Oligonukleotidisynteesin saannoksi määritettiin 23,3 nmol (58,3 %). Fraktiot karakterisoitiin massaspektrometrisesti ennen niiden yhdistämistä. ESI-MS: $[M-3H]^{3-}$ m/z: 8574,2 (havaittu); 8575,0 (laskettu).



Kuva 4: PEGyloidun oligonukleotidin **ON2** massaspektri

2.1.3 Sense RNA

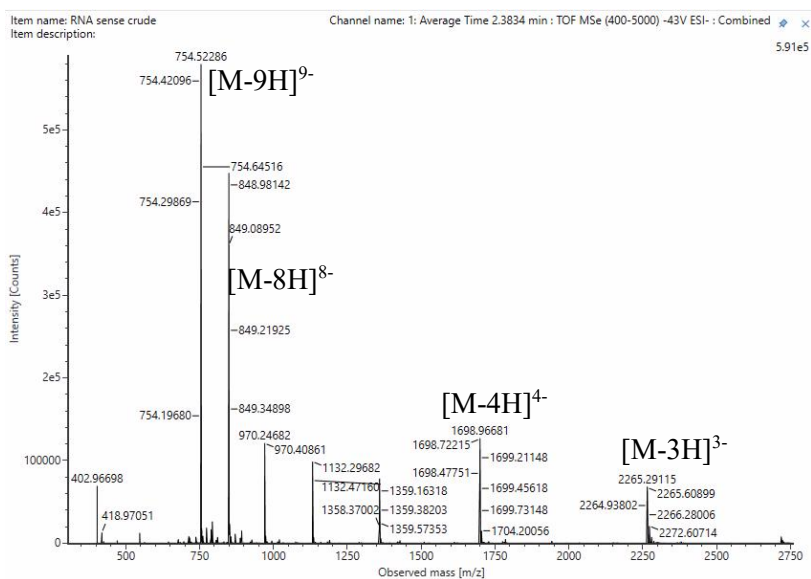


Kaavio 9: Sense-oligonukleotidien **ON4-ON7** synteetit. a) FAM-leimaus, b) BCN-kytkentä.

Sense-RNA-oligonukleotidin **ON4** (sekvensi 5'-GGU CAU CCA UGA CAA CUU U[dT][dT]-3') synteetiä varten tarvittavat fosforamidiitit punnittiin, kuivattiin eksikkaattorissa ja liuotettiin kuivaan asetonitriliin. CPG-kantaja punnittiin 5 µmol skaalan mukaisesti oligosynteesikoloniin. Oligonukleotidisynteesi ja ammonolyysi suoritettiin samoin, kuin antisense-juosteen kanssa (luku 2.1). Samaten silyyliin poiston protokolla⁷⁵ oli sama, mutta skaalana oli 5 µmol.

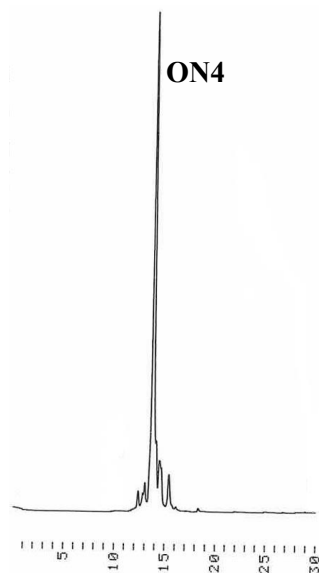
Tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 5), joten synteetiä voitiin jatkaa eteenpäin.

ESI-MS: $[M-3H]^{3-}$ m/z: 6798,9 (havaittu); 6800,2 (laskettu).



Kuva 5: Oligonukleotidin **ON4** raakatuotteen massaspektri

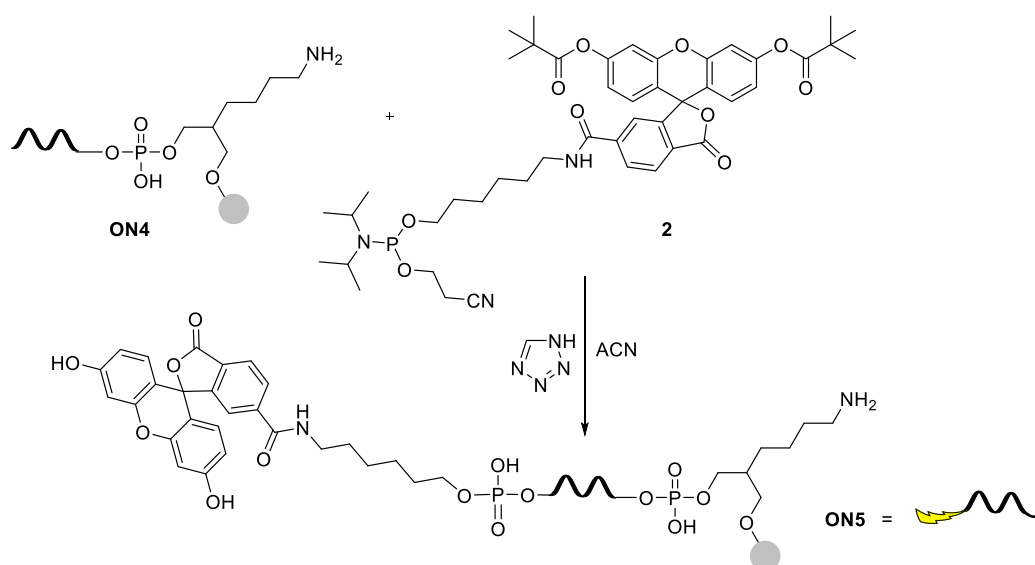
Raakatuote puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 × 10 mm, 5 μm). Ajogradienttina oli 30 min 5–35 % ACN (kuva 6) ja detektioaallonpituutena 260 nm.



Kuva 6: Oligonukleotidin **ON4** raakatuotteen HPLC-kromatogrammi. Päätuote on kromatogrammin isoin piikki.

Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli. Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleaasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti. Oligonukleotidisynteesin saannoksi määritettiin 2,3 μmol (45 %).

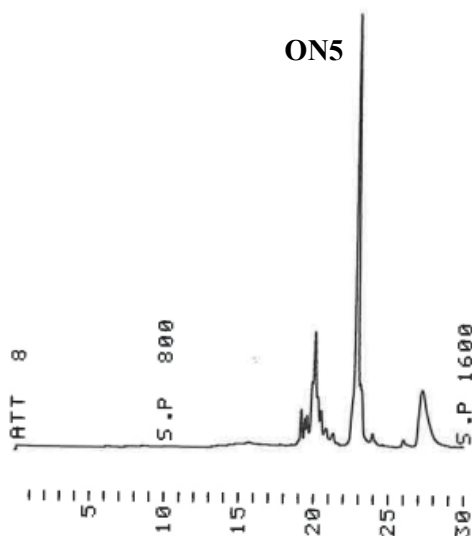
2.1.4 6-FAM-sense RNA



Kaavio 10: Oligonukleotidin **ON5** synteesi

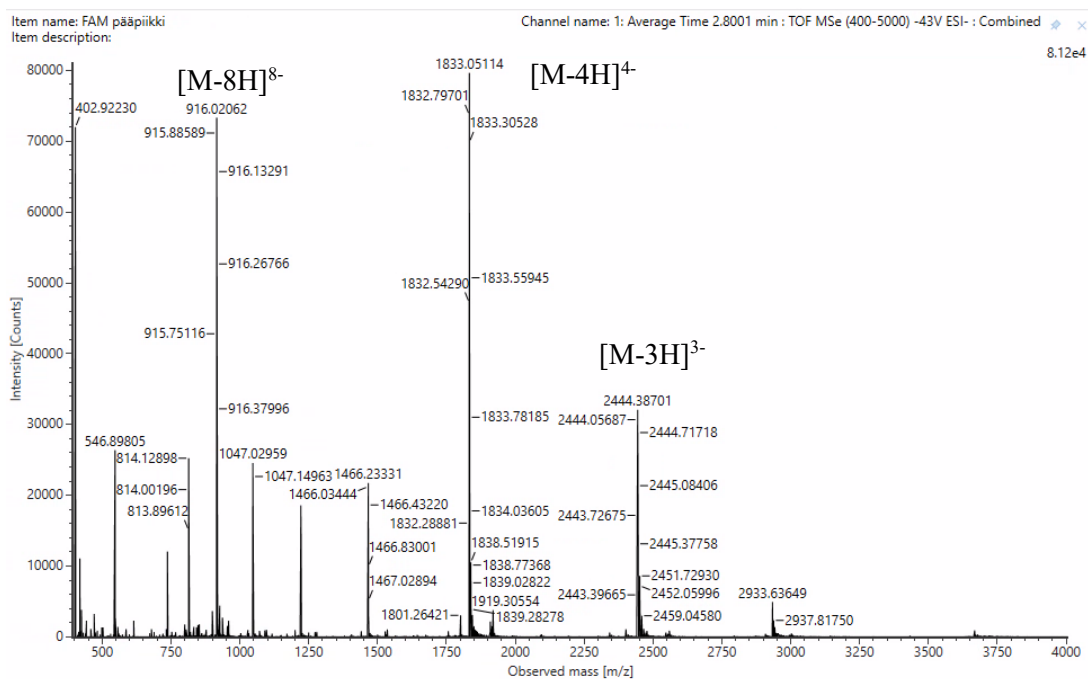
Reaktio suoritettiin typpi-ilmakehässä. 6-FAM-fosforamidiittia (Lumiprobe) **2** (8,44 mg; 10 μmol ; 20 ekv) liuotettiin 350 μl :aan kuivaa asetonitriiliä, johon sekoitettiin vielä 11 μmol (24 μl ; 1,1 ekv) tetratsolia (0,45 M liuos asetonitriilissä). Saatu liuos siirrettiin kantajan päälle ja liuosta inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan välillä sekoittaen. Kantaja pestiin asetonitriilillä ja hapetettiin oligonukleotidisyntetisaattorin hapetinliuoksella (Oxidizer, kat. L060050, sisältö pyridiini/vesi/jodi 9/1/12,7 (v/v/w)) huuhtelemalla kantajaa kolonnissa 1 ml ruiskujen avulla. Kantaja pestiin asetonitriilillä ja kuivattiin eksikkaattorissa. Raakatuotetta inkuboitiin 25 % ammoniakissa (400 μl) huoneenlämmössä 30 minuuttin ajan, jotta FAM-leiman sivureaktiot metyyliamiinin kanssa estetään. Seokseen lisättiin vielä metyyliamiini (400 μl), ja inkuboitiin huoneenlämmössä vielä 2 h. Väliuote pestiin nukleasivapaalla vedellä ja haihdutettiin kuiviin. Väliuotteelle suoritettiin luvussa 2.1.1 kuvattu silyyliin poistoon laadittu protokolla⁷⁵ 1 μmol skaalassa.

Raakatuote puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 x 10 mm, 5 μm). Ajogradienttina oli 30 min 5–35 % ACN (kuva 7) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli.



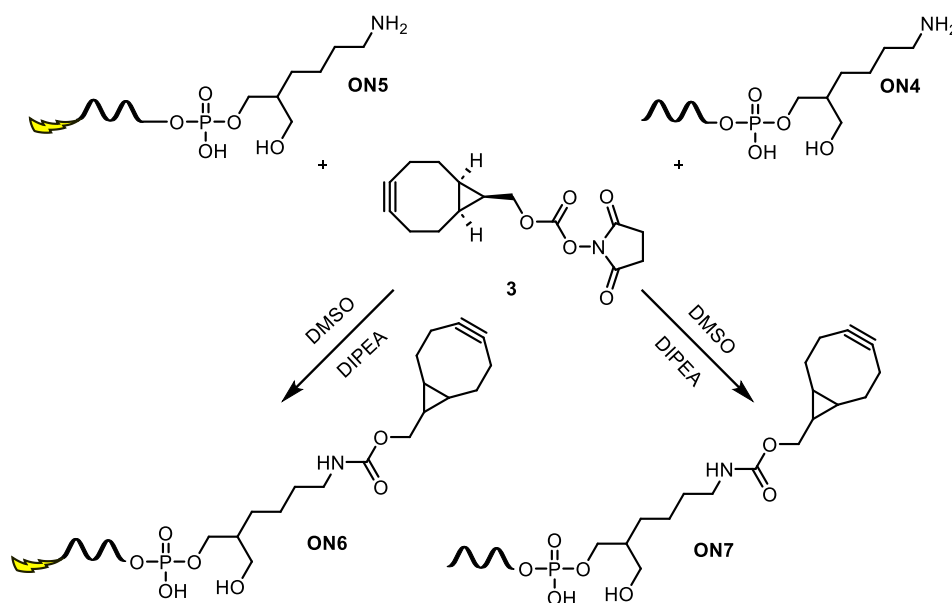
Kuva 7: Oligonukleotidin **ON5** HPLC-kromatogrammi

Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti ja määritettiin 6-FAM-leimauksen saannoksi 72 nmol (14 %). Fraktiot karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 8) ennen niiden yhdistämistä. ESI-MS: $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ m/z: 7336,2 (havaittu); 7338,2 (laskettu).



Kuva 8: Oligonukleotidin **ON5** massaspektri

2.1.5 BCN-sense RNA

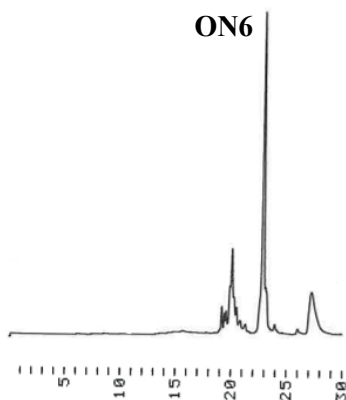


Kaavio 11: Oligonukleotidien **ON6** ja **ON7** synteesit

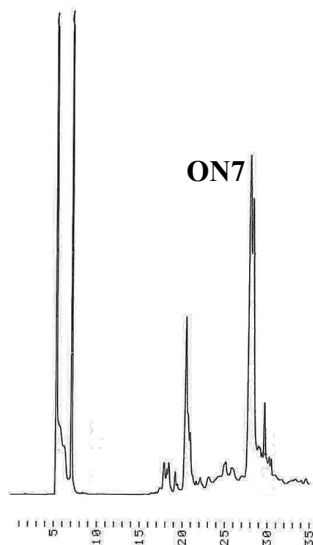
Mikrosentrifugiputkeen haihdutetun **ON5**:n (112 nmol) joukkoon lisättiin BCN-NHS:n **3** DMSO-liuosta (8,33 μ l; 1,67 μ mol) ja DIPEA:n DMSO-liuosta (8,33 μ l; 1,67 μ mol). Reaktio annettiin edetä 2 h huoneenlämmössä. Reaktiotuote puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM-trietyyliammoniumasetaatti (TEAA)-ajoliuksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitrilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 x 10 mm, 5 μ m). Ajogradienttina oli 30 min 5–35 % ACN (kuva 9) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin

kuivaksi. Eristetyn tuotteen **ON6** saannoksi määritettiin 32,5 nmol (29 %) ja tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 11). ESI-MS: $[M-3H]^{3-}$ m/z: 7513,6 (havaittu); 7514,4 (laskettu).

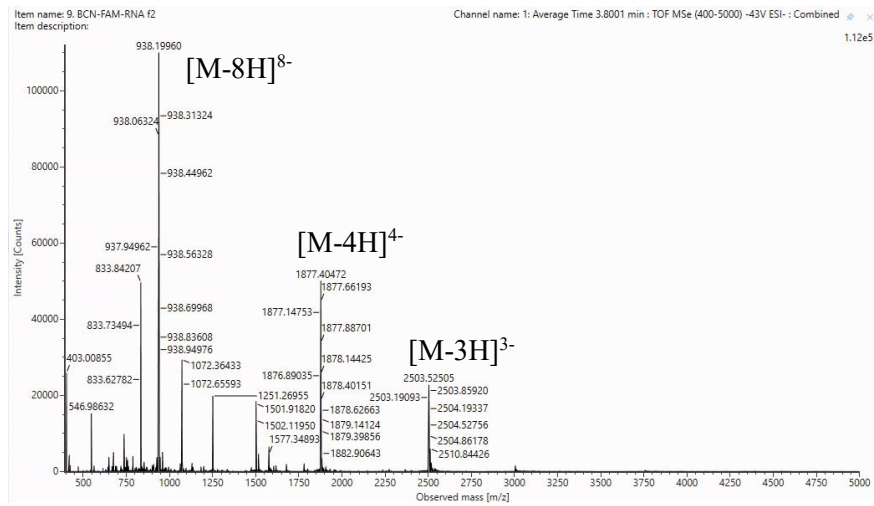
Mikrosentrifugiputkeen kuiviin haihdutettuun **ON4** (500 nmol) lisättiin BCN-NHS-esterin **3** DMSO-liuosta (37,5 μ l; 7,5 μ mol) ja DIPEA:n DMSO-liuosta (1,3 μ l; 7,5 μ mol). Reaktioon annettiin edetä 2 h huoneenlämmössä. Reaktiotuote puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM-trietyyliammoniumasetaatti (TEAA)-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä Clarity Oligo RP-kolonnilla (250 x 10 mm, 5 μ m). Ajogradienttina oli 35 min 5–40 % ACN (kuva 10) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuivaksi. Eristetyn tuotteen **ON7** saannoksi määritettiin 266,6 nmol (53 %) ja tuote karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 12). ESI-MS: $[M-3H]^{3-}$ m/z: 6975,3 (havaittu); 6976,4 (laskettu).



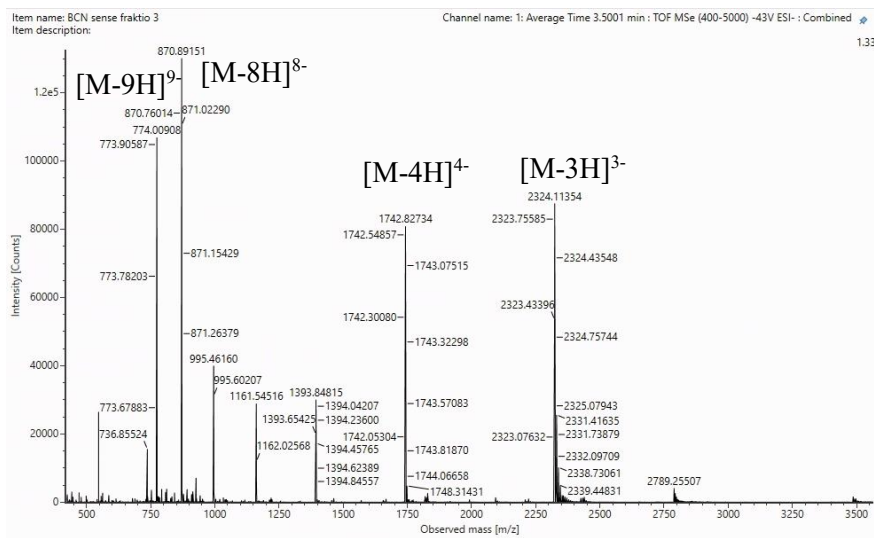
Kuva 9: Oligonukleotidin **ON6** HPLC-kromatogrammi



Kuva 10: Oligonukleotidin **ON6** HPLC-kromatogrammi

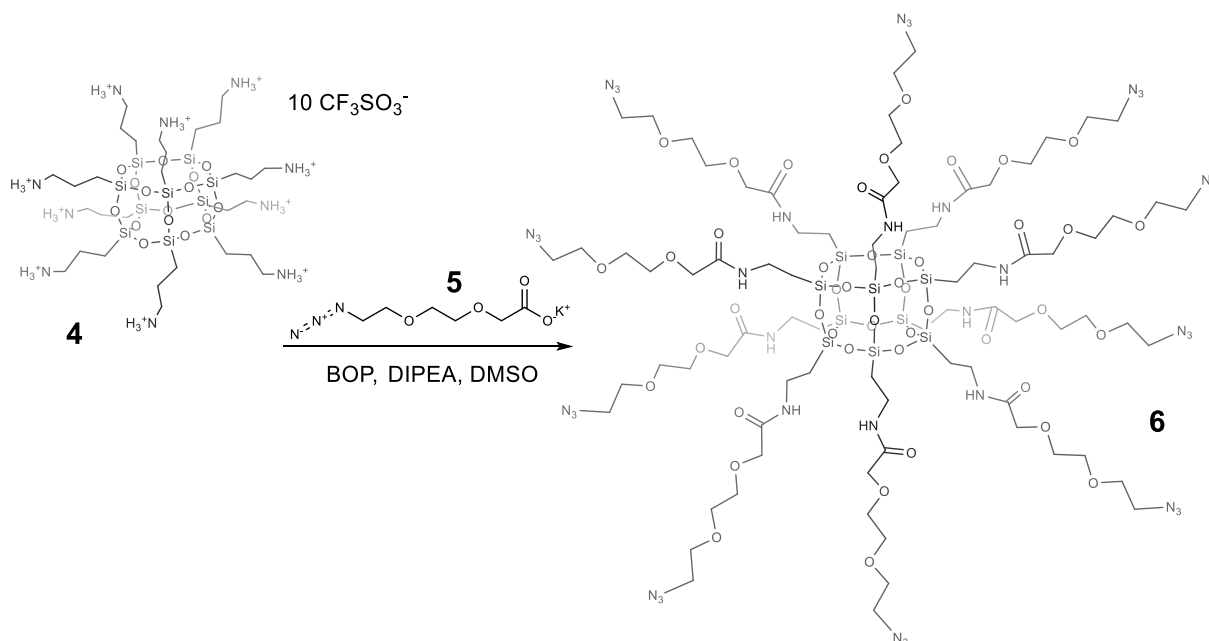


Kuva 11: Oligonukleotidin ON7 massaspektri



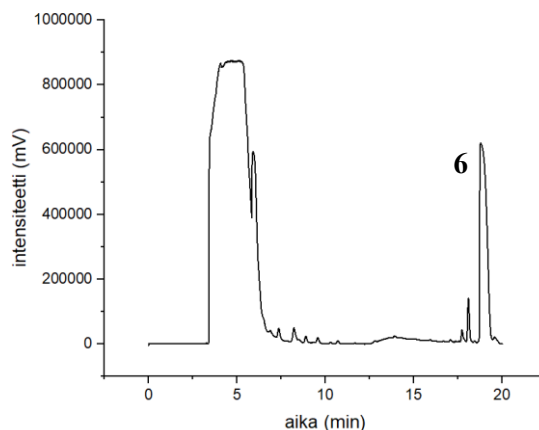
Kuva 12: Oligonukleotidin ON7 massaspektri

2.2 10-kätisen COSS-ydinrakenteen synteesi



Kaavio 12: T10-COSS-ydinrakenteen **6** atsidisynteesi

Mikrosentrifugiputkeen punnittiin ryhmässä aikaisemmin valmistettua T10-COSS-ydinrakennetta **4** (3,8 μmol , 10,0 mg). Sekaan lisättiin erillisiin mikrosentrifugiputkiin punnitut kalium-2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etikkahappoasettaatti (AEEA- K^+) **5** (13,6 mg; 59,8 μmol) ja BOP-reagenssi (bentsotriatsoli-1-yloksitris(dimetyyliamino)fosfoni-hexafluorofosfaatti; 25,8 mg; 58,3 μmol), jotka molemmat oli liuotettu 50 μl :aan DMSO:ta. Seokseen lisättiin DIPEA:a (38,5 μmol ; 6,7 μl) ja reaktio jätettiin huoneenlämpöön ravistelijaan yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin HPLC:llä MQ-H₂O ja ACN-ajoliuksilla Aeris 5 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å-kolonnilla (250 \times 10,0 mm). Ajogradienttina oli 20 min 40–70 % ACN (kuva 13) ja detektioaallonpituutena 220 nm. Tuotefraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin.



Kuva 13: T10-COSS-ydinrakenteen **6** HPLC-kromatogrammi

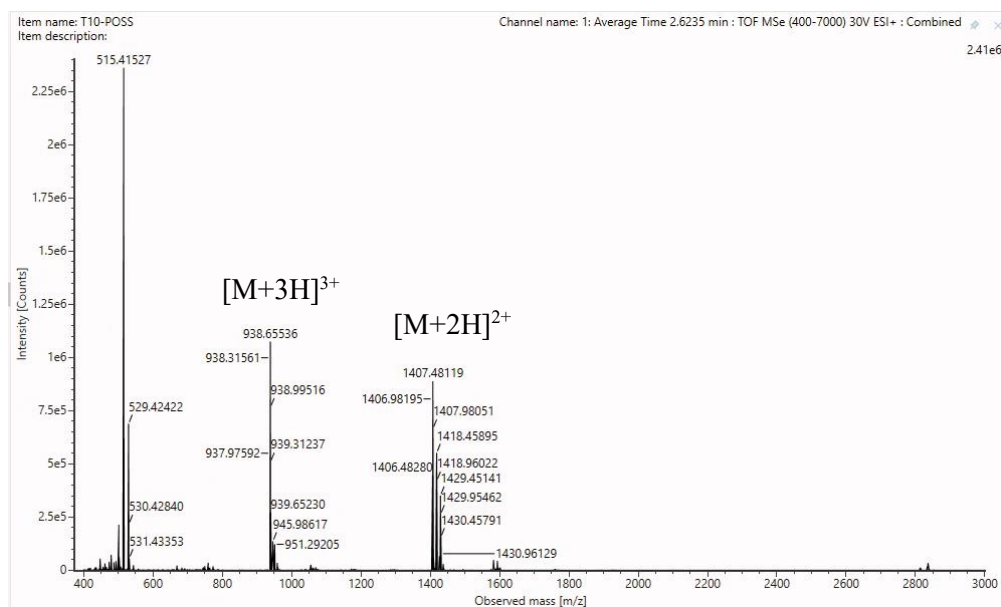
Eksikkaattorissa kuivattu tuote **6** liuotettiin deuteroituun DMSO:hon ja analysoitiin massaspektrometrisesti (kuva 14) sekä NMR-spektroskopisesti. Reaktiion saannoksi määritettiin 1,7 μmol (45 %).

ESI⁺-MS: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z: 2813,0 (havaittu); 2813,4 (laskettu).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): 0,551 (1H, t); 1,465 (1H, q); 3,076 (1H, k); 3,322 (1H, m); 3,400 (1H, m); 3,606 (3H, m); 3,881 (1H, s) [liite 1]

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): 21,48; 25,95; 38,41–40,06; 49,36; 54,31; 68,65–69,57; 129,03 [liite 2]

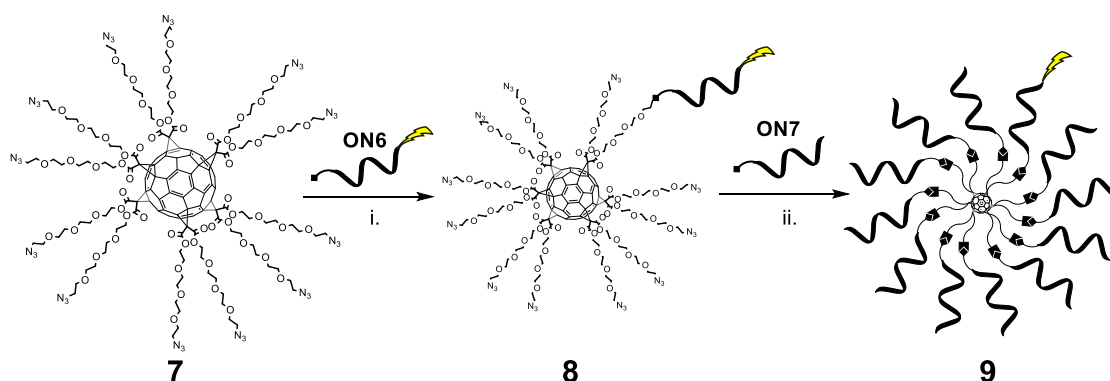
²⁹Si-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): -68,19 [liite 3]



Kuva 14: T10-COSS-ydinrakenteen **6** massaspektri

2.3 Pallonukleiinihappojen kokoaminen

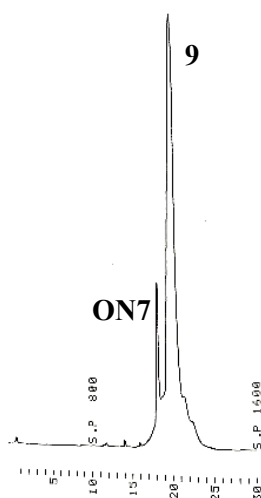
2.3.1 Fullereeniydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi



Kaavio 13: C60-pallonukleiinihapon kokoaminen. i) 80:20 DMSO: NFW (v/v) ON RT, ii) 0,75 M NaCl NFW:ssä 3 vrk RT.

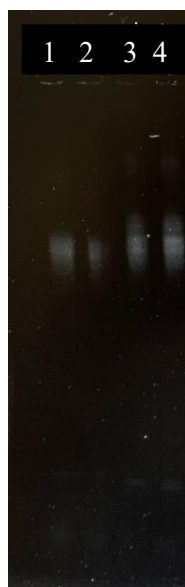
Monofunktionalisoitua tuotetta **8** ei tarvinnut valmistaa uudelleen, sillä sitä riitti varastoista edellisen työntekijän jäljiltä. Syntetisoitu monofunktionalisointituote **8** (10 nmol) ja 16 ekvivalenttia (160 nmol, 552 μ l) oligonukleotidia **ON7** yhdistettiin ja kuivattiin ja liuotettiin 721,6 μ l:aan 0,75 M NaCl- nukleasivapaata vesiliuosta. Reaktiota inkuboitiin ravistelijassa huoneenlämmössä kolmen vuorokauden ajan.

Täysfunktionalisoitu tuote **9** puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM-trietyyliammoniumasetaatti (TEAA)-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitrilissä Aeris WIDEPORÉ XB-C18-kolonnilla (150 x 4,6 mm, 3,6 μ m). Ajogradienttina oli 30 min 5–45 % ACN (kuva 15) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli.



Kuva 15: C60-täysfunktionalisointituotteen **9** HPLC-kromatogrammi

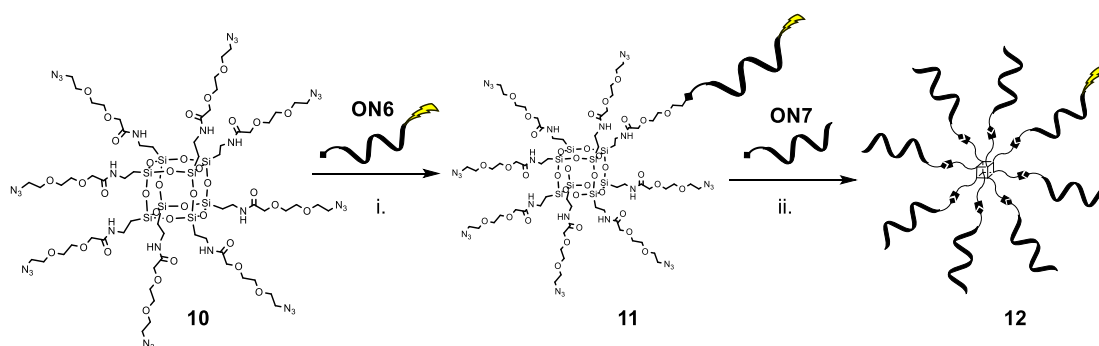
Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti. Täysfunktionalisaatioreaktion saannoksi saatiin 2,2 nmol (22 %). Fraktiot karakterisoitiin PAGE:lla (kuva 16) ja verrattiin ryhmässä aikaisemmin valmistettuun tuotteeseen **9**, jonka tiedettiin olevan hyvänlaatuista.



Kuva 16: Tuotteen **9** geielektrogrammi (1: oma 0,5 pmol, 2: oma 0,125 pmol, 3: aikaisemmin valmistettu 0,5 pmol, 4: aikaisemmin valmistettu 0,75 pmol)

PAGE:n perusteella juuri valmistettu tuote **9** (PAGE kaivot 1 & 2) ei vastannut täysin laadultaan ryhmässä aikaisemmin valmistettua tuotetta **9** (PAGE kaivot 3 & 4), joten jatkokokeisiin valmistetut näytteet tehtiin varmasti toimivalla, aikaisemmin valmistetulla lopputuotteella.

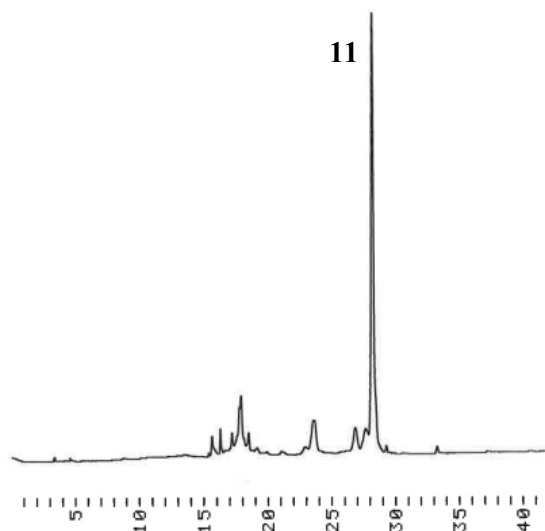
2.3.2 T8-COSS-ydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi



Kaavio 14: T8-COSS-pallonukleinihapon kokoaminen. i) 80:20 DMSO: NFW (v/v) ON RT, ii) 0,75 M NaCl NFW:ssä 3 vrk RT

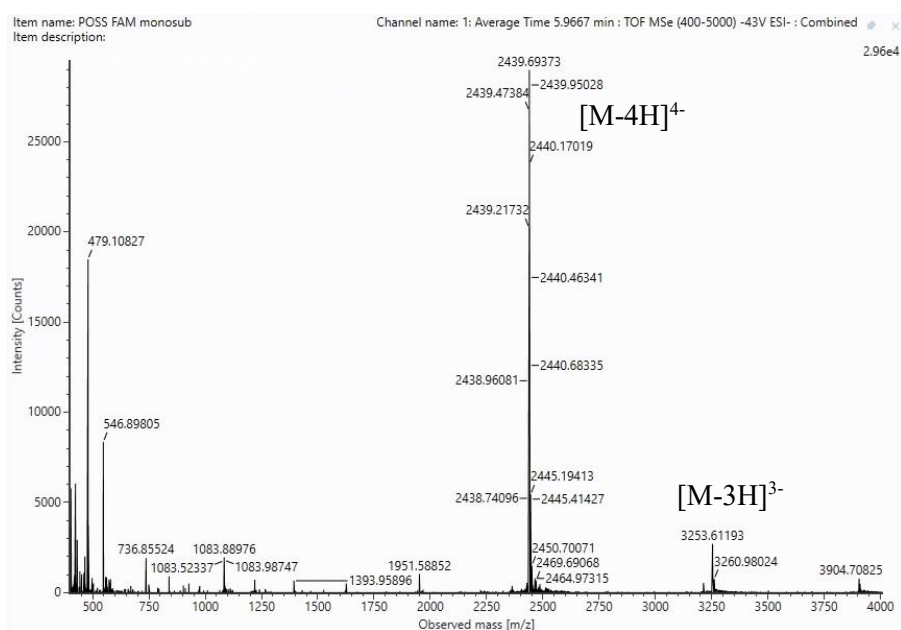
Monofunktionalisointireaktiossa käytettiin ryhmässä aikaisemmin valmistettua 8-kätistä [COSS]-ydinrakennetta **10**. Oligonukleotidi **ON6** (30 nmol; 12,7 µl NFW:ssä) ja ydinrakenne **10** (90 nmol; 18 µl DMSO:ssa; 3 ekv) yhdistettiin ja reaktioon lisättiin 32,8 µl DMSO:ta, jolloin

lopulliseksi reaktioympäristöksi saatiin DMSO: NFW 80:20 (v/v). Reaktiota inkuboitin huoneenlämmössä yön yli. Monofunktionalisointituote **11** puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitrilissä ODS HYPERSIL-kolonnilla (250 × 4,6 mm, 5 μm). Ajogradienttina oli 30 min 20–80 % ACN (kuva 17) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuivaksi.



Kuva 17: T8-FAM-COSS monofunktionalisointituotteen **11** HPLC-kromatogrammi

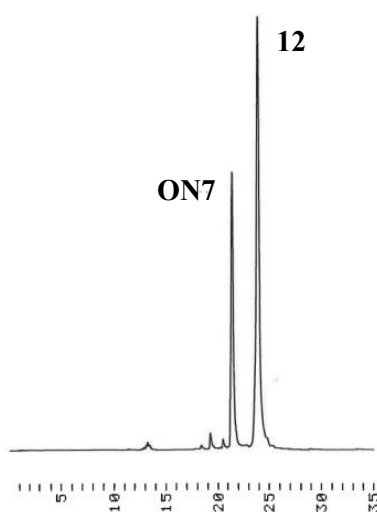
Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin MilliQ-veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti ja määritettiin monofunktionalisaatioreaktion saannoksi 20,7 nmol (17,2 %). Fraktiot karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 18) ennen niiden yhdistämistä. ESI-MS: $[M-4H]^{4-}$ m/z: 9762,8 (havaittu); 9765,1 (laskettu).



Kuva 18: T8-FAM-COSS monofunktionalisointituotteen **11** massaspektri

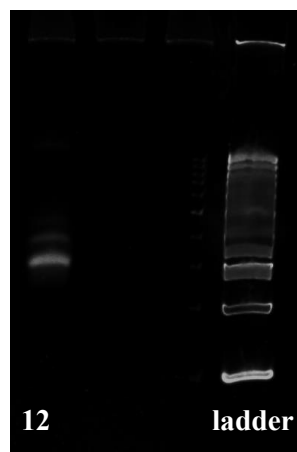
Kaikki jäljellä oleva monofunktionalisointituote **11** (5,71 nmol) ja 12 ekvivalenttia (68,52 nmol, 145 μ l) oligonukleotidia **ON7** kuivattiin ja liuotettiin 137,2 μ l:aan 0,75 M NaCl-nukleasivapaata vesiliuosta. Reaktiota inkuboitii ravistelijassa huoneenlämmössä kolmen vuorokauden ajan.

Täysfunktionalisoitu vesiliukoinen tuote **12** puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuoksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä Aeris WIDEPORE XB-C8-kolonnilla (150 \times 4,6 mm, 3,6 μ m). Ajogradienttina oli 35 min 5–40 % ACN (kuva 19) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli.



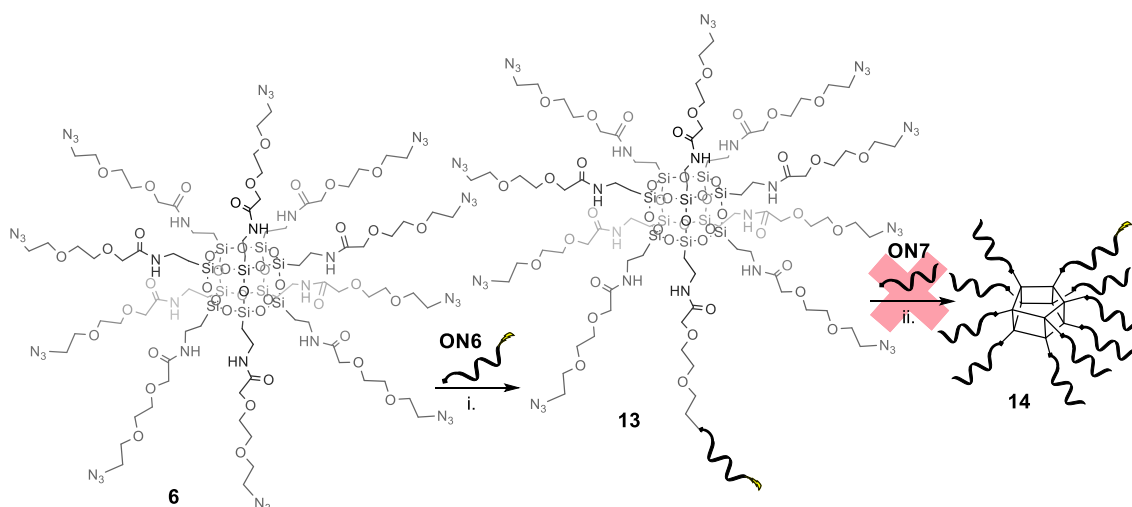
Kuva 19: T8-COSS täysfunktionalisointituotteen **12** HPLC-kromatogrammi

Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti. Täysfunktionalisaatioreaktion saannoksi saatiin 3,9 nmol (68 %). Fraktiot karakterisoitiin PAGE:lla (kuva 20).



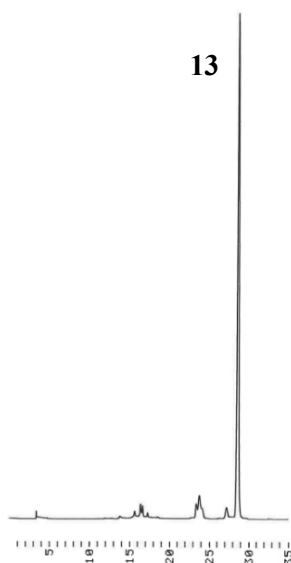
Kuva 20: Tuotteen **12** geielektrogrammi

2.3.3 T10-COSS-ydinrakenteen mono- ja täysfunktionalisointi



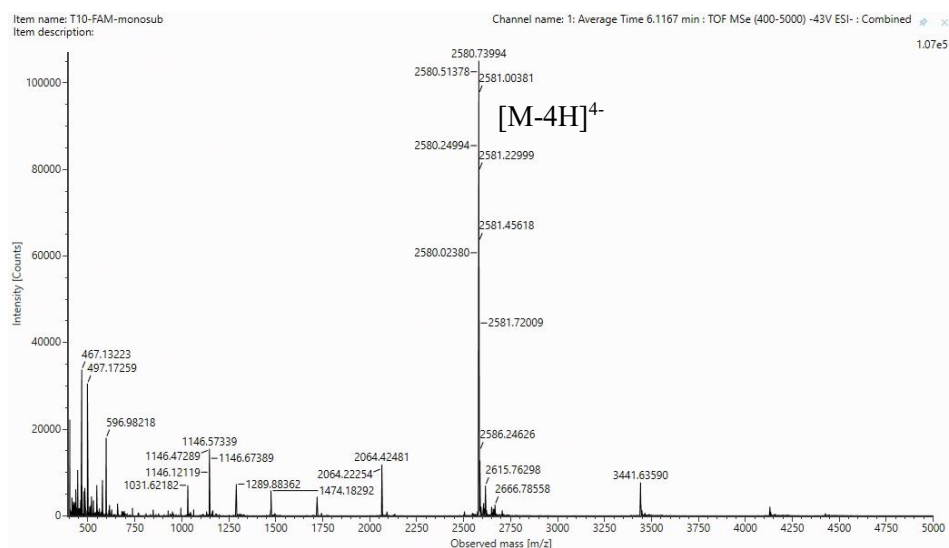
Kaavio 15: T10-COSS-ydinrakenteen suunniteltu mono- ja täysfunktionalisoinnin reaktiokaavio. i: monofunktionalisaatio 80:20 DMSO: NFW (v/v) RT ON, ii: täysfunktionalisaatio useissa eri olosuhteissa (taulukko xy). Viimeinen synteesivaihe epäonnistui, eikä lopputuotetta saatu yrityksistä huolimatta tehtyä hyvälaatuisena.

Oligonukleotidi **ON6** (7 nmol; 12,4 μ l) ja 10-kätinen [COSS]-ydinrakenne **6** (21 nmol; 7 μ l; 3 ekv) yhdistettiin ja seokseen lisättiin 42,6 μ l DMSO:ta, jolloin lopulliseksi reaktioympäristöksi saatiin DMSO: NFW 80:20 (v/v). Reaktiota inkuboitii huoneenlämmössä yön yli. Monofunktionalisointituote **13** puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitriilissä ODS HYPERSIL-kolonnilla (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Ajogradienttina oli 35 min 5–69 % ACN (kuva 21) ja detektioaallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli.



Kuva 21: T10-FAM-COSS monofunktionalisointituotteen **13** HPLC-kromatogrammi.

Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin nukleasivapaaseen veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti ja määritettiin monofunktionalisaatioreaktion saannoksi 5,7 nmol (81 %). Fraktiot karakterisoitiin massaspektrometrisesti (kuva 22) ennen niiden yhdistämistä. ESI-MS: $[M-4H]^+$ m/z: 10327,0 (havaittu); 10327,8 (laskettu).



Kuva 22: T10-FAM-COSS monofunktionalisointituotteen **13** massaspektri

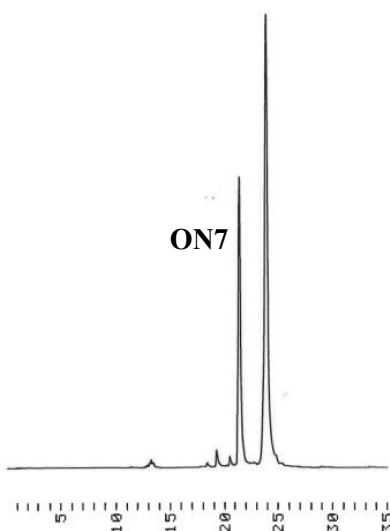
Monofunktionalisointituote **13** ja oligonukleotidi **ON7** (15 ekv) haihdutettiin mikrosentrifugiputkeen ja liuotettiin eri liuosseksiin taulukon 4 mukaisesti. Reaktioita inkuboitiin kolmen vuorokauden ajan, ellei ole toisin kuvattu. Reaktioiden tulokset tarkistettiin PAGE:lla.

Taulukko 4: T10-COSS-täysfunktionalisointireaktion (kaavio 15) testiolosuhteita. Ei onnistunut=PAGE-näyte ei-homogeeninen eli reaktiossa jäljellä alifunktionalisoituneita rakenteita.

Olosuhteet	n(13) / V(reaktio) _{kok}	Kommentit
kuiva pyridiini + 1 M LiCl + ravistelu yön yli	0,5 nmol / 23,5 µl	sakkasi yön aikana, säädettiin liukoiseksi kuivalla DMSO:lla (lopullinen reaktioseos 1:4 DMSO:pyr (v/v) -> ei onnistunut
kuiva pyridiini + 2 M LiCl	0,5 nmol / 16,4 µl	sakkasi yön aikana, säädettiin liukoiseksi kuivalla DMSO:lla (lopullinen reaktioseos 3:4 DMSO:pyr (v/v) -> ei onnistunut
100 mM TEAA-puskuri MQ-vedessä	0,5 nmol / 10 µl	-
100 mM TEAA-puskuri + 0,75 M NaCl MQ-vedessä	0,5 nmol / 10 µl	-
0,75 M NaCl	1,5 nmol / 9 µl	-
0,75 M NaCl	5,5 nmol / 33 µl	-
0,75 M NaCl, lämmitys 55 °C 2 vrk	2 nmol / 12,5 µl	-

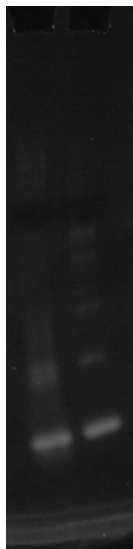
0,75 M NaCl, sonikointi 2 vrk	2 nmol / 12,5 μ l	-
DMSO:NFW 25:75 (v/v), 0,75 M NaCl	0,5 nmol / 36,5 μ l	korjattiin liukoiseksi yön jälkeen, lopulliset olosuhteet 20:80 DMSO:NFW (v/v), 0,45 M NaCl -> ei onnistunut
DMSO:NFW 50:50 (v/v), 0,75 M NaCl	0,5 nmol / 24 μ l	korjattiin liukoiseksi yön jälkeen, lopulliset olosuhteet 45:55 DMSO:NFW (v/v), 0,313 M NaCl ei onnistunut
DMSO:NFW 75:25 (v/v), 0,75 M NaCl	0,5 nmol / 23 μ l	korjattiin liukoiseksi yön jälkeen, lopulliset olosuhteet 30:70 DMSO:NFW (v/v), 0,326 M NaCl, lämmitys 35 °C ON -> ei onnistunut
0,375 M NaCl NFW:ssä	0,5 nmol / 32,1 μ l	ei liukoisuusongelmia, ei onnistunut
1,5 M NaCl NFW:ssä	0,5 nmol / 44,1 μ l	ei liukoisuusongelmia, ei onnistunut
DMSO:NFW 50:50 (v/v), 2 ekv oligonukleotidiä/haara	0,5 nmol / 22 μ l	korjattiin liukoiseksi yön jälkeen, lopulliset olosuhteet 25:75 DMSO:NFW (v/v), 0,34 M NaCl -> ei onnistunut
0,75 M NaCl NFW:ssä	2 nmol	Alkuperäinen olosuhde. ei liukoisuusongelmia, ei onnistunut

Reaktioseokset puhdistettiin HPLC-kromatografisesti 50 mM TEAA-ajoliuksilla (pH = 7) MilliQ-vedessä ja asetonitrilissä Aeris WIDEPORÉ XB-C8-kolonnilla (150 x 4,6 mm, 3,6 μ m). Ajogradienttina oli 35 min 5–40 % ACN (kuva 23) ja detektioallonpituutena 260 nm. Kerätyt HPLC-fraktiot haihdutettiin kuiviin yön yli.



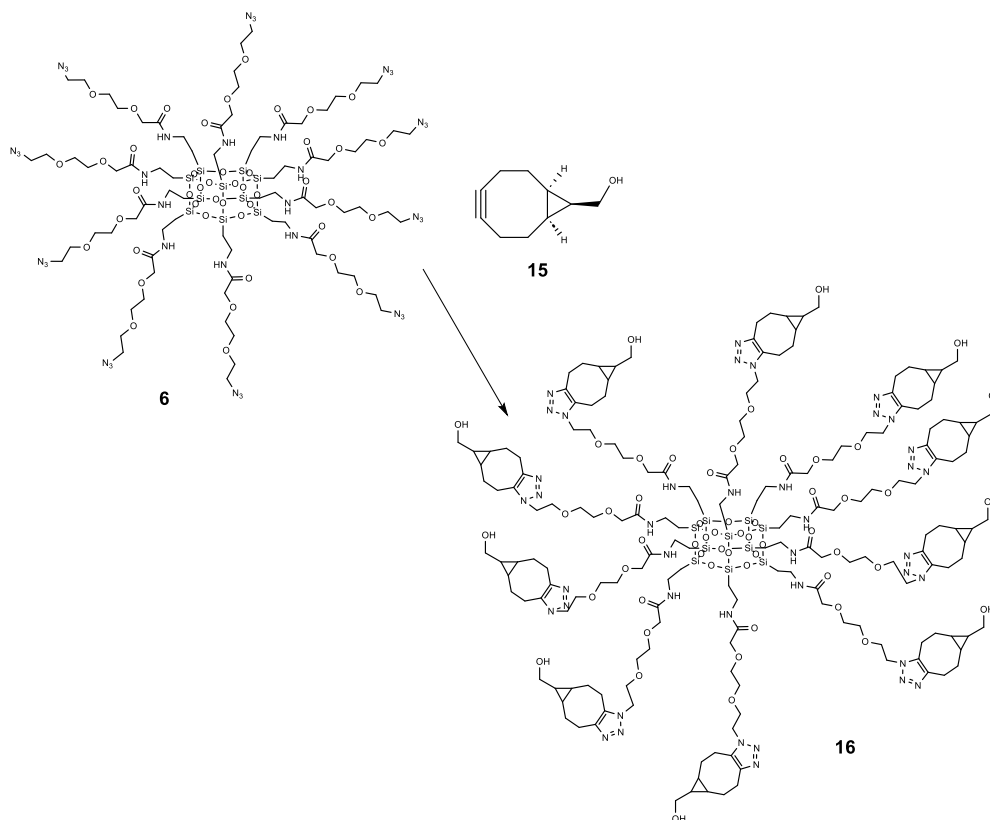
Kuva 23: T10-FAM-COSS täysfunktionalisointireaktion HPLC-kromatogrammi. Kromatogrammin suurin piikki edustaa reaktiossa syntynyttä vajaasti funktionalisoitua välituotetta, joka ei reagoanut edelleen.

Kerätyt HPLC-fraktiot liuotettiin MilliQ-veteen ennen konsentraatiomäärittystä UV-spektrofotometrisesti. Tuotefraktiot karakterisoiitiin PAGE:lla (kuva 24).

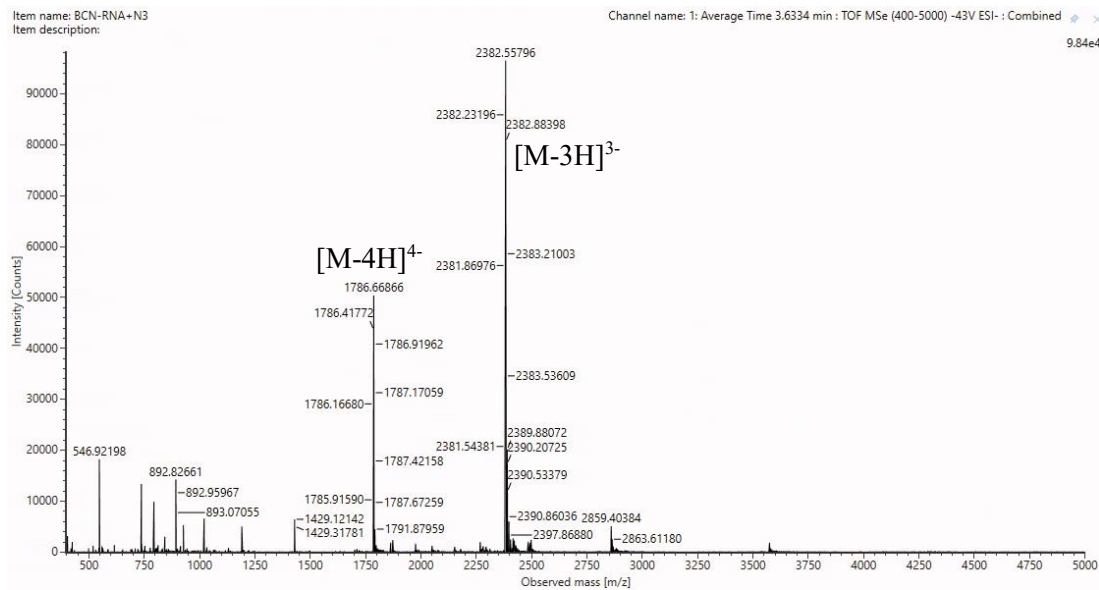


Kuva 24: Esimerkki epäonnistuneen T10-FAM-COSS täysfunktionalisointireaktion geielektrogrammista, josta erottuu alifunktionalisoituneita SNA-rakenteita ja reagoimatonta oligonukleotidia **ON7**.

Ydinrakenteen **6** ja oligonukleotidin **ON7** reaktiivisuus testattiin erikseen pienmolekyyleillä **15** ja **17** (kaaviot 16 ja 17), jotta syy täysfunktionalisoinnin vajaaksi jäämiselle selviäisi.



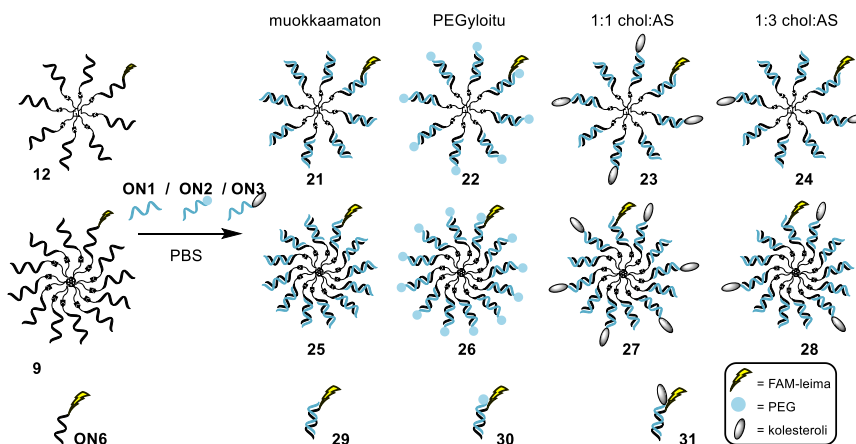
Kaavio 16: T10-COSS **6** +BCN-MeOH **15** testireaktio



Kuva 26: atsidi+BCN-RNA raakatuotteen **18** massaspektri

Pienmolekyylit testit todistivat oligonukleotidin **ON7** ja ydinrakenteen **6** reaktiivisuuden erikseen, eli syy siRNA-T10-COSS-täysfunktionalisaatioreaktion epäonnistumiselle ei ole reaktion osapuolten laadussa.

2.4 Pallonukleiinihappojen hybridisaatio ja sisäänottokokeiden näytevalmistus



Kaavio 18: siRNA-SNA:iden ja solukokeissa käytettyjen näytteiden valmistus

Pallonukleiinihapot hybridisoitiin antisense-juosteiden **ON1**, **ON2** ja **ON3** seoksilla PBS:ssä. Lähtöaineet yhdistettiin mikrosentrifugiputkissa ja haihdutusjäännökset liuotettiin 200 µl PBS:ään ($c = 2,5 \mu\text{M}$ efekt.) taulukon 5 mukaisesti. Näin saatiin aikaan solukokeissa käytetyt pallonukleiinihaponäytteet **21–28** ja hybridisoidut vapaat oligonukleotidinäytteet ilman ydinrakennetta **29–31** (kaavio 18). Vaihtoehtoiset modifikaatiot (muokkaamaton antisense, PEGylointi, 1:1-kolesteroli:antisense ja 1:3-kolesteroli:antisense) testattiin jokaisen vaihtoehtoisen ydinrakenteen ja vapaan oligonukleotidin kohdalla. PEGyloituja

oligonukleotideja sisältävien näytteiden laatu varmistettiin PAGE:lla (kuva 27). Muiden rakenteiden osalta hybridisaation tiedettiin onnistuvan täydellisesti aikaisempien töiden perusteella, joten jokaista näytevalmistusta ei validoitu PAGE:lla.

Taulukko 5: esimerkki eräästä näytesetin valmistuksesta. Eri komponentit yhdistettiin mikrosentrifugiputkiin, haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin 200 µl:aan 1xPBS:ää solukokeita varten.

näyte	n(9),pmol	n(12),pmol	n(ON6),pmol	n(ON1),pmol	n(ON2),pmol	n(ON3),pmol
21	41,7	-	-	500	-	-
22	41,7	-	-	-	500	-
23	41,7	-	-	250	-	250
24	41,7	-	-	375	-	125
25	-	62,5	-	500	-	-
26	-	62,5	-	-	500	-
27	-	62,5	-	250	-	250
28	-	62,5	-	375	-	125
29	-	-	500	500	-	-
30	-	-	500	-	500	-
31	-	-	500	-	-	500



Kuva 27: PEG-hybridisoinnin laadunvarmistus PAGE:lla (1: 12 eq AS, 2: 6:6 AS:PEG, 3: 4:8 AS:PEG, 4: 12 eq PEG, 5: 24 eq PEG)

2.5 ARPE-19 solujen sisäänottokokeet

Ihmisen verkkokalvon pigmenttiepiteelisolulinja ARPE-19 (CRL-2302™, ATCC) otettiin käyttöön kemian laitoksen solulaboratoriossa. Soluja viljeltiin T25- ja T75-viljelyastioissa

DMEM F-12-kasvatusliuoksessa (sis 10 % FBS ja 1 % penisilliini+streptomysiini antibiootti), ja inkuboitin 5 % CO₂:ssa, 37 °C:ssa. Solujen sisäänottokokeissa efektiivinen siRNA-konsentraatio oli 200 nM ja kontrollina toimivat hoitamattomat solut (ilman nanopartikkelia).

Koetta edeltävänä päivänä solut viljeltiin 12-kuoppalevyille (200 000 solua/kuoppa, V=1 ml) ja solujen annettiin kiinnittyä kuoppalevyille 24±2 tuntia. Seuraavana päivänä kasvatusliuos vaihdettiin näyteformulaatioihin (920 µl kasvatusliuos sis. 10 % FBS ja 1 % antibiootti, 80 µl 2,5 µM näyte-stockit), (loppuarvot siis V=1 ml, c(siRNA)=0,2 µM efekt.). Näytteiden annettiin inkuboitua solujen kanssa 37 °C:ssa (5 % CO₂) tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen solut pestiin kahdesti 1xHBSS-puskurilla (sis. 10 mM HEPES). Solujen irrotusta varten kuoppiin lisättiin 300 µl TrypLE-entsyymiä ja soluja inkuboitin 37 °C:ssa (5 % CO₂) noin viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen sekaan lisättiin edellä mainittua 1xHBSS (sis. 10 mM HEPES) -liuosta, solut suspensoitiin ja suspensiot siirrettiin 1,5 ml mikrosentrifugiputkiin. Liuokset sentrifugoitiin 150 × g:ssä viiden minuutin ajan, supernatanti poistettiin ja solupelletti suspensoitiin 300 µl:aan kylmää 1xHBSS-liuosta (sis. 10 mM HEPES, 4 % FBS, 8 µM EDTA). Solususpensio suodatettiin 96-kuoppalevyille pipetinkärkeen asetetun suodattimen avulla (Flowmi Cell Strainers, 40 µm, Merck).

Näytteet mitattiin BD LSRFortessa-virtausytometrillä ilmajäähdytetyllä Coherent™ Sapphire™ kiinteän faasin sinisellä diodilaserilla (488nm, 50mW), BD FACSDiVa™ v.8-ohjelmistoa käyttäen. Tulokset analysoitiin FlowJo™ v.10-ohjelmistolla. FAM-leiman fluoresenssiarvoista määritettiin geometriset keskiarvostatistiikat. Jokaisesta partikkelinäytteestä tehtiin yhteensä n=6 replikaattia (3 biologista, 2 teknillistä/koe).

3 Tulokset ja niiden tarkastelu

3.1 Synteetit

Kaikki halutut oligonukleotidit syntetisoitiin onnistuneesti. Reaktiot pystyttiin puhdistamaan HPLC:llä ja käytetyt gradientit mahdollistivat hyvän erottuvuuden. Oligonukleotidisynteesien saannot vaihtelivat 14–54 %:n välillä, tuottaen massaspektrometrinen karakterisoinnin mukaan riittävän homogeenisiä lopputuotteita. Alhaisin saanto tuli kiinteällä kantajalla tapahtuneesta FAM-leimauksesta.

Pallonukleiinihapporakenteiden synteetit onnistuivat vaihtelevasti. Mono- ja täysfunktionalisaatioreaktiot pystyttiin puhdistamaan tehokkaasti HPLC:llä ja monofunktionalisaatiotuotteet pystyttiin karakterisoimaan massaspektrometrisesti. C60-fullereeniytimellisen pallonukleiinihapporakenteen mono- ja täysfunktionalisaatioreaktiot saatiin tehtyä saannoilla 30 % ja 62 %. Täysfunktionalisaatioreaktiossa kuitenkin kohdattiin haasteita PAGE:n perusteella riittävän puhtaan lopputuotteen aikaansaamisessa, jonka takia päädyttiin käyttämään ryhmässä aikaisemmin onnistuneesti syntetisoitua ja homogeeniseksi todettua lopputuotetta **9**. T8-COSS-silsekvioksaaniytimellisen pallonukleiinihapporakenteen mono- ja täysfunktionalisaatioreaktiot onnistuivat toivotusti saannoilla 51 % ja 89 %, tuottaen PAGE:n perusteella riittävän homogeenistä lopputuotetta **12**. C60- ja T8-COSS-ydinrakenteista jälkimmäisen synteetit onnistuivat paremmin tuottaen myös luotettavammin PAGE:n perusteella hyvälaatuista täysfunktionalisoitua lopputuotetta.

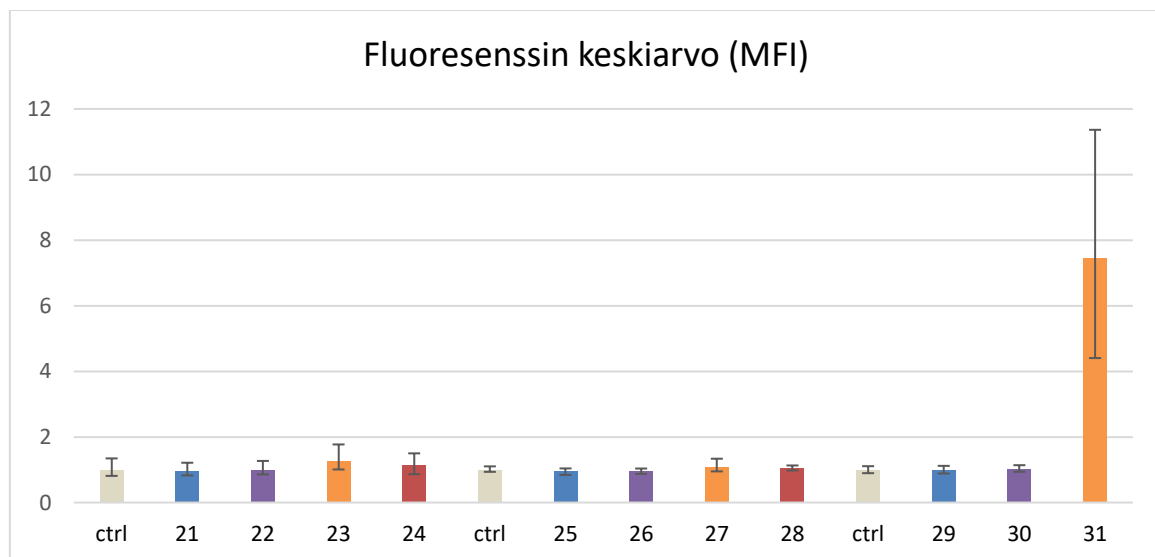
Pallonukleiinihappokontekstissa kokonaan uutta, kymmenkätistä silsekvioksaaniin perustuvaa T10-COSS-ydinrakennetta yritettiin syntetisoida. Lähtöaine **4** oli syntynyt 8-kätisen COSS-ydinrakenteen sivutuotteena ryhmässä tehtyjen aikaisempien töiden kautta. Monofunktionalisaatioreaktio onnistui toivotusti ja erottui hyvin HPLC:llä. Lopputuote **13** saatiin karakterisoitua massaspektrometrisesti ja saantoprosentti oli monofunktionalisaatioreaktioista paras, 81 %. Täysfunktionalisaatioreaktiossa kohdattiin kuitenkin ylitsepääsemättömiä ongelmia. HPLC:n ja PAGE:n profiileista nähtiin suuri määrä reagoimatonta oligonukleotidia ja vain vajaasti funktionalisoituja SNA-välituotteita. Ydinrakenteen ja oligonukleotidien reaktiivisuus erikseen varmennettiin pienmolekyylilikeilla hyödyntäen BCN-metanolia ja atsidia. Nämä reaktiot tapahtuivat nopeasti ja tehokkaasti, jolloin saatiin varmistus lähtöaineiden hyvästä laadusta ja reaktiivisuudesta.

3.2 Virtausytometrinen analyysi siRNA-näytteiden solujen sisäänottokokeille

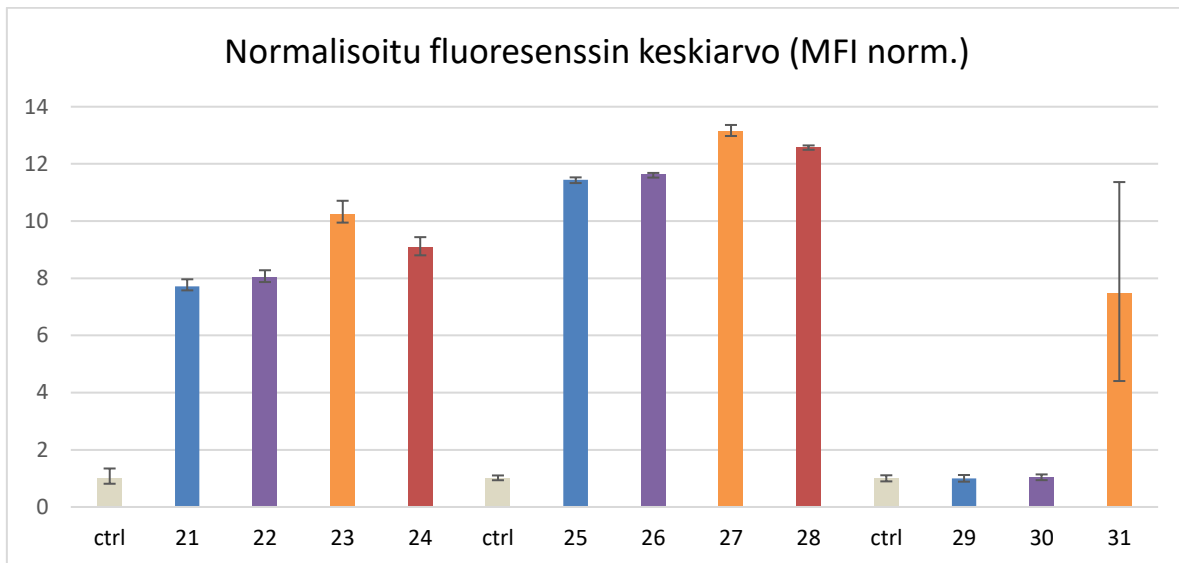
ARPE-19-solukokeissa kohdattiin aluksi haasteita virtausytometrillä, sillä solut aggregoituivat helposti toisiinsa. Ongelma saatiin kuitenkin ratkaistua lisäämällä EDTA:a lopulliseen näyteliuokseen, joka vähensi aggregoitumista ja varmisti mittausten onnistumisen.

Virtausytometrisistä mittauksista kootut tulokset näkyvät diagrammissa 1. Mittauksissa seurattun FAM-leiman intensiteetti-arvoista laskettiin geometriset keskiarvot näytteiden **21–31** replikaattien kesken. Geometriset keskiarvot suhteutettiin kussakin kokeessa käytettyyn kontrollinäytteeseen (ctrl, pelkät solut ilman nanopartikkeleita) niin, että kontrollinäyte saa arvon 1. Virhepalkit määritettiin suurimman ja pienimmän fluoresenssiarvon perusteella.

Diagrammi 1: Virtausytometristen mittausten tulos (n=6).



Vapaat oligonukleotidit sisältävät FAM-leiman sense-juosteessaan, joten jokainen hybridisoitu partikkeli sisältää yhden leiman. Kuitenkin SNA-rakenteissa vain yksi käsivarsi sisältää FAM-leimatun sense-juosteen, vaikka koko rakenteessa on yhteensä 8 tai 12 käsivartta. SNA-näytteet voidaan siis vielä normalisoida havainnollistamaan todellista soluun kulkeutunutta oligonukleotidikuormaa kertomalla SNA-näytteen MFI-arvot sen kätisyyden määrällä (COSS-SNA:lla 8 ja C60-SNA:lla 12) olettaen, että SNA-rakenne pysyy ehjänä koko kuljetuksen ajan. Normalisoidut tulokset näkyvät diagrammissa 2.

Diagrammi 2: SNA-kätisyyden määrällä normalisoidut virtausytometriset tulokset.

Ei-normalisoiduista tuloksista (Diagrammi 1) nähdään, että erot solun sisäänotossa eri SNA-rakenteiden välillä ovat todella pieniä. Varsinaiset ydinrakenteista johtuvat vaikutukset SNA:n terapeutiseen toimintaan saatetaan nähdä vasta geenihiljennys- tai sytotoksisuuskokeissa. Pallonukleiinihapporakenteista kolesterolimuokatut rakenteet kulkeutuvat soluihin kaikista tehokkaimmin, vaikka erot eri rakenteiden välillä ovat pieniä. 1:1-kolesteroli-antisense-suhde näyttäisi toimivan hieman 1:3-suhdetta tehokkaammin. Pegylointi ei näytä vaikuttavan sisäänottokykyyn yhtään muokkaamatonta rakennetta paremmin kaikissa näytetyypeissä (SNA:t ja oligonukleotidit).

Vapaiden oligonukleotidinäytteiden **29–31** välillä ainoastaan kolesterolimuokattu hybridisoitu siRNA-oligonukleotidi **31** kulkeutuu solun sisälle tehokkaasti kontrolliin verrattuna.

4 Johtopäätökset

Syntetisoitujen siRNA-oligonukleotidien sekvenssi kohtaa monet kriteerit, joita luvussa 1.3 esiteltiin. Sekvenssit ovat 21-meerejä, joiden GC-pitoisuus on 38 %. Sekvensseissä ei esiinny palindromeja tai toistuvia sekvenssejä, jotka haittaisivat oikeanlaisen hybridisoitumisen syntymistä vastinjuosteen kanssa. Antisense-juosteen 5'-päässä on enemmän A-emästä, joka mahdollistaa heikomman emäspariutumisen ja vastaavasti sense-juosteen 3'-päässä on RNAaseja vastaan puolustuskykyä tuova dT-emäsjoukko. SNA-valmistuksessa käytetyistä ydinrakenteista silseskvioksaaniydinrakenne on fullereenia ympäristöystävällisempi sekä bioyhteesopiva ja -hajoava, ja osoittautui myös synteisivaiheessa helppokäyttöisemmäksi ja luotettavammaksi.

Karkean arvion mukaan PAGE:n perusteella pisimmälle reagoanut T10-COSS-SNA oli noin 8:sti funktionalisoitu. Reaktion etenemiseen pyrittiin vaikuttamaan reaktio-olosuhteita muuttamalla, sillä alkuperäinen ajatus reaktion keskeytymisen syyllä oli edelleen funktionalisoituvan pallonukleiinihapporakenteen muuttuvat liukoisuusominaisuudet. Lopulta kaikkien yritysten epäonnistuesssa jouduttiin toteamaan, että todennäköisin syy reaktion pysähtymiselle vajaan funktionalisaatioasteeseen olisi oligonukleotidien tiheys kohteena olevassa pallonukleiinihapossa. Liian tiheä rakenne aiheuttaa merkittävien steristen esteiden muodostumisen, eikä pitkä oligonukleotidijuoste pääse enää reagoimaan ydinrakenteen kanssa. Aikaisempiin 8- ja 12-kätisiin rakenteisiin verrattuna 10-kätinen rakenne on myös symmetrisesti erilainen, jolloin rakenteen kemialliset ominaisuudet ovat odotetusti erilaiset.

Erot solun sisäänotossa eri ydinrakenteiden välillä ovat pieniä, eivätkä riitä perustelemaan toisen ydinrakenteen paremmuutta sisäänotto-ominaisuuksien suhteen. Myös ennen MFI-arvojen normalisointia SNA-näytteiden fluoresenssiarvot ovat erittäin lähellä kontrolleja, joka viittaisi vain vähäiseen solun sisäänottoon. Kontrolleille asetettu pohja-arvo 1 edustaa solujen luonnollista autofluoresenssia. Osassa näytteistä saaduissa tuloksissa (Diagrammi 1) MFI-arvot ovat alle pohja-arvon. Tämä viittaisi jonkinlaiseen kokeen aikana tapahtuneeseen asiaan, joka vähentää solujen fluoresenssia. Syy voisi olla esimerkiksi solujen kohtaama stressi joko näytteiden keruu- ja/tai pesuvaiheen tai itse partikkelikäsittelyn seurauksena. Tähän ratkaisuna voisi toimia kokeiden toisto suuremmilla partikkelikonsentraatioilla, hellävaraisemmalla näytevalmistuksella (pesuliuosten tai välineiden vaihto) tai konsentraatiosarjan teko yhdellä SNA-rakenteella, jotta riittävän merkittäviä tuloksia voitaisiin varmuudella saada.

Oligonukleotidien ja muokkausten suhteen kolesterolimuokkaus osoittautui odotetusti parantavan solun sisäänottokykyä eniten kaikissa rakenteissa. Kolesterolimuokkaus tehostaa myös pallonukleiinihaponäytteistä eniten soluun kulkeutumista, mikä selittyy pallonukleiinihaporakenteen lipofiilisyyden kasvulla kolesterolimäärän kasvaessa rakenteen pinnalla. Pegyloinnilla ei nähdä merkittävää vaikutusta solun sisäänottoon. Tämä voi osin selittyä sillä, ettei pegyloinnin pääasiallinen tarkoitus ole tehostaa solun sisäänottoa vaan ennemmin pidentää koko partikkelin kiertoaikaa elimistössä. Pegyloinnin merkitys tulisiinkin siis vasta näkemään *in vivo*-kokeissa, jossa rakenteiden distribuutiota ja puoliintumisaikaa seurataan. Vasta tällöin myös ihanteellinen Pegyloinnin suhde rakenteissa saataisiin selville, jotta munuaissuodatusta pystyttäisiin välttämään ilman, että solun sisäänottokyky kohdesoluun häiriintyy liikaa. Munuaissuodatuksen välttämiseksi ei tulisi tosin huolehtia liikaa, jos annostelutapa olisi paikallinen eikä systeeminen.

Virtausytometrisestä analyysistä saatiin lisätietoa solukulkeutumisen ominaisuuksista eri partikkeleilla, mutta kokonaiskuvan hahmottamiseksi geenihiljennys- ja sytotoksisuuskokeet ovat erittäin tarpeellisia. Suoritetut kokeet eivät anna vielä tarpeeksi lisätietoa eri rakenteiden paremmuusjärjestyksestä, jotta joitain rakenteita voitaisiin poissulkea näytepatteristosta. Tämänlainen rajausta olisi järkevää tehdä vasta koko *in vitro*-koesarjan valmistuttua.

Virtausytometrisissä kokeissa kontrollina toimivat hoitamattomat (engl. non-treated) solut. Varmuutta tulosten luotettavuudesta saataisiin myös kasvatettua sillä, että koesarjaan lisättäisiin positiivinen tai negatiivinen kontrolli käyttämällä partikkeleita, joiden käyttäytyminen ja soveltuvuus analyysimenetelmiin tunnettaisiin hyvin. GAPDH on itsessään myös geenihiljennyskokeissa usein käytetty positiivinen kontrolli, jolloin geenihiljennyskokeita varten tulee valita joku toinen, yhtä luotettava kontrolligeeni vertailukohteeksi.

FAM-fluoreskeini-leima valikoitui näissä synteeseissä käyttökelpoisimmaksi siksi, että sitä oli saatavilla fosforamidiittina. Tämä mahdollisti leimauksen tekemisen kantajalla, jolloin itse synteesi olisi käytännöllisin suorittaa ja reaktion saanto olisi mahdollisimman korkea. FAM-leima ei kuitenkaan ole kaikista vastaavista leimoista vahvimmin fluoresoiva ja on emissio- ja absorptiomaksimeiltaan myös solujen autofluoresenssia erittäin lähellä. Nämä tekijät vaikeuttivat leiman detektointia soluista varsinkin alhaisilla partikkelikonsentraatioilla. Tästä syystä vielä suurempaa näytekonsentraatiota olisi voinut käyttää näissäkin kokeissa, jotta suurempi ero kontrolleihin olisi saatu aikaiseksi. FAM-leiman ei tulisi kuitenkaan vaikuttaa

rakenteiden biologiseen käyttäytymiseen liikaa, jolloin konsentraatio *in vitro*-kokeissa voi olla suhteellisen korkea. *In vitro*-kokeissa käytetyt konsentraatiot tulee kuitenkin lopulta suhteuttaa mahdollisiin terapeuttisiin annosmääriin, jotka olisivat tarpeellisia ihmiselle annosteltaessa halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi. Terapeuttisen annoksen tulisi olla realistinen ja käytännöllisesti annosteltavissa. Annostelutavalla tulee myös olemaan tähän suuri merkitys, ja varmin tapa saada tarpeellinen annos mahdollisimman lähelle kohdekudosta on pistää lääke suoraan silmään. Elimistön rajapintojen ansiosta lääke tulisi levittymään vain vähän silmän rakenteiden ulkopuolelle.

Valmistetut siRNA-oligonukleotidit ovat kontrolligeeni GAPDH:lle sekvenssoituja. GAPDH-siRNA-SNA:illa saaduilla tuloksilla pystytään siis ottamaan kantaa vain solun sisäänottokykyyn, eikä varsinaiseen hoitopotentiaaliin VEGF-perusteisen AMD:n hoidossa. Tässä tutkimuksessa saadut tulokset yhdessä aikaisempien ja seuraavien töiden kanssa toimivat kuitenkin hyvinä suuntaviivoina tuloksista, joita mahdollisesti tulevaisuudessa syntetisoitavilla VEGF-siRNA-SNA:illa voitaisiin saada. Mahdollisella VEGF-siRNA-SNA:lla kuitenkin kohdattaisiin samoja haasteita AMD:n hoidossa, kuten aptameerien ja vasta-aineiden kanssa. Hoito olisi onnistuessaan vain taudin etenemistä hidastava, eikä suoraan sitä estävä. Lisätutkimuksia siis AMD:lle altistavista tekijöistä vaaditaan, jotta esimerkiksi hypoksian tai silmänpaineen syntymisen ja etenemisen juurisyyt saadaan selville.

Tästä työstä saatujen tulosten perusteella pallonukleiinihapot eivät vielä näillä muokkauksilla ole ihanteellisia terapeuttista tarkoitustaan ajatellen. Sisäänotto- ja geenihiljennysominaisuuksien tulisi olla jo suhteellisen pienillä pitoisuuksilla tehokasta ilman, että solujen elävyys huononee. Matka on myös vielä erittäin pitkä siihen, että siRNA-pallonukleiinihapot olisivat tehokkuudeltaan edes vertailukelpoisia vasta-ainelääkkeiden kanssa, jotka tällä hetkellä hallitsevat AMD:n hoitomuotoja.

5 Viitteet

- (1) Hannon, G. J. RNA Interference. *Nature* **2022**, *418*, 244–251.
- (2) Friedrich, M.; Aigner, A. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs*. Adis September 1, 2022, pp 549–571. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3>.
- (3) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and Specific Genetic Interference by DsRNA. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- (4) *Illustrated information. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach 2025*. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/illustrated-information/> (accessed 2025-03-31).
- (5) Dias, M. F.; Cruz-Cazarim, E. L. C.; Pittella, F.; Baião, A.; Pacheco, A. C.; Sarmiento, B.; Fialho, S. L. Co-Delivery of Antioxidants and siRNA-VEGF: Promising Treatment for Age-Related Macular Degeneration. *Drug Delivery and Translational Research*. Springer 2025. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01772-x>.
- (6) Inderbir S. Padda; Arun U. Mahtani; Preeti Patel; Mayur Parmar. *Small Interfering RNA (siRNA) Therapy*. [Updated 2024 Mar 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580472/>.
- (7) Hoy, S. M. Patisiran: First Global Approval. *Drugs* **2018**, *78* (15), 1625–1631. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>.
- (8) Scott, L. J. Givosiran: First Approval. *Drugs*. Adis February 1, 2020, pp 335–339. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0>.
- (9) Scott, L. J.; Keam, S. J. Lumasiran: First Approval. *Drugs*. Adis February 1, 2021, pp 277–282. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01463-0>.
- (10) Lamb, Y. N. Inclisiran: First Approval. *Drugs*. Adis February 1, 2021, pp 389–395. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01473-6>.
- (11) Keam, S. J. Vutrisiran: First Approval. *Drugs* **2022**, *82* (13), 1419–1425. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01765-5>.
- (12) Syed, Y. Y. Nedosiran: First Approval. *Drugs* **2023**, *83* (18), 1729–1733. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01976-4>.
- (13) Jing, X.; Arya, V.; Reynolds, K. S.; Rogers, H. Clinical Pharmacology of RNA Interference-Based Therapeutics: A Summary Based on Food and Drug Administration-Approved Small Interfering RNAs. *Drug Metabolism and Disposition* **2023**, *51* (2), 193–198. <https://doi.org/10.1124/dmd.122.001107>.
- (14) Ruchi, R.; Raman, G. M.; Kumar, V.; Bahal, R. Evolution of Antisense Oligonucleotides: Navigating Nucleic Acid Chemistry and Delivery Challenges. *Expert Opin Drug Discov* **2025**, *20* (1), 63–80. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2440095>.

- (15) *VITRAVENE: ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS*.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vitravene#product-info> (accessed 2025-06-14).
- (16) Perry, C. M.; Barman Balfour, J. A. *Fomivirsen*.
- (17) Bege, M.; Borbás, A. Rise and Fall of Fomivirsen, the First Approved Gene Silencing Medicine : A Historical Review. *Acta Pharm Hung* **2022**, *92* (1), 38–44.
<https://doi.org/10.33892/aph.2022.92.38-44>.
- (18) Ng, E. W. M.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. Pegaptanib, a Targeted Anti-VEGF Aptamer for Ocular Vascular Disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. February 2006, pp 123–132. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>.
- (19) Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu Rev Med* **2005**, *56*, 555–583. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.062904.144915>.
- (20) Boomer, R. M.; Lewis, S. D.; Healy, J. M.; Kurz, M.; Wilson, C.; McCauley, T. G. Conjugation to Polyethylene Glycol Polymer Promotes Aptamer Biodistribution to Healthy and Inflamed Tissues. *Oligonucleotides* **2005**, *15* (3), 183–195.
<https://doi.org/10.1089/oli.2005.15.183>.
- (21) Guzman-Aranguez, A.; Loma, P.; Pintor, J. Small-Interfering RNAs (SiRNAs) as a Promising Tool for Ocular Therapy. *British Journal of Pharmacology*. October 2013, pp 730–747.
<https://doi.org/10.1111/bph.12330>.
- (22) Kaiser, P. K.; Symons, R. C. A.; Shah, S. M.; Quinlan, E. J.; Tabandeh, H.; Do, D. V.; Reisen, G.; Lockridge, J. A.; Short, B.; Guerciolini, R.; Nguyen, Q. D. RNAi-Based Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration by Sirna-027. *Am J Ophthalmol* **2010**, *150* (1), 33-39.e2. <https://doi.org/10.1016/J.AJO.2010.02.006>.
- (23) Garba, A. O.; Mousa, S. A. Bevasiranib for the Treatment of Wet, Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Eye Dis* **2010**, *2*, OED.S4878. <https://doi.org/10.4137/oed.s4878>.
- (24) *Novel siRNA technology, which eliminates the need to deliver vectors for cell selective activation, Switch raised \$52 million to target CNS diseases*.
<https://biodiscover.com/industry/741554.html>.
- (25) Ahn, I.; Kang, C. S.; Han, J. Where Should SiRNAs Go: Applicable Organs for SiRNA Drugs. *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature July 1, 2023, pp 1283–1292.
<https://doi.org/10.1038/s12276-023-00998-y>.
- (26) Khvorova, A.; Watts, J. K. The Chemical Evolution of Oligonucleotide Therapies of Clinical Utility. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group March 1, 2017, pp 238–248.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3765>.
- (27) Ali Zaidi, S. S.; Fatima, F.; Ali Zaidi, S. A.; Zhou, D.; Deng, W.; Liu, S. Engineering SiRNA Therapeutics: Challenges and Strategies. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd December 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02147-z>.

- (28) Yu, J.-Y.; Deruiter, S. L.; Turner, D. L. *RNA Interference by Expression of Short-Interfering RNAs and Hairpin RNAs in Mammalian Cells*; 2002.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.092143499.
- (29) Lee, N. S.; Dohjima, T.; Bauer, G.; Li, H.; Li, M.-J.; Ehsani, A.; Salvaterra, P.; Rossi, J. *Expression of Small Interfering RNAs Targeted against HIV-1 Rev Transcripts in Human Cells*; 2002. <http://biotech.nature.com>.
- (30) Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S.; Khvorova, A. Rational SiRNA Design for RNA Interference. *Nat Biotechnol* **2004**, *22* (3), 326–330.
<https://doi.org/10.1038/nbt936>.
- (31) Safari, F.; Barouji, S. R.; Tamaddon, A. M. Strategies for Improving SiRNA-Induced Gene Silencing Efficiency. *Adv Pharm Bull* **2017**, *7* (4), 603–609.
<https://doi.org/10.15171/apb.2017.072>.
- (32) Birmingham, A.; Anderson, E.; Sullivan, K.; Reynolds, A.; Boese, Q.; Leake, D.; Karpilow, J.; Khvorova, A. A Protocol for Designing SiRNAs with High Functionality and Specificity. *Nat Protoc* **2007**, *2* (9), 2068–2078. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.278>.
- (33) Amarzguioui, M.; Prydz, H. An Algorithm for Selection of Functional SiRNA Sequences. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *316* (4), 1050–1058.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.02.157>.
- (34) Guan, C. M.; Chinen, A. B.; Ferrer, J. R.; Ko, C. H.; Mirkin, C. A. Impact of Sequence Specificity of Spherical Nucleic Acids on Macrophage Activation in Vitro and in Vivo. *Mol Pharm* **2019**, *16* (10), 4223–4229. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00561>.
- (35) Rajappa, M.; Saxena, P.; Kaur, J. Ocular Angiogenesis: Mechanisms and Recent Advances in Therapy. *Adv Clin Chem* **2010**, *50*, 103–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(10\)50006-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(10)50006-4).
- (36) Gao, S.; Dagnaes-Hansen, F.; Nielsen, E. J. B.; Wengel, J.; Besenbacher, F.; Howard, K. A.; Kjems, J. The Effect of Chemical Modification and Nanoparticle Formulation on Stability and Biodistribution of SiRNA in Mice. *Molecular Therapy* **2009**, *17* (7), 1225–1233.
<https://doi.org/10.1038/MT.2009.91>.
- (37) Fattal, E.; Bochot, A. Ocular Delivery of Nucleic Acids: Antisense Oligonucleotides, Aptamers and SiRNA. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, *58* (11), 1203–1223.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2006.07.020>.
- (38) Ramasamy, T.; Ruttala, H. B.; Munusamy, S.; Chakraborty, N.; Kim, J. O. Nano Drug Delivery Systems for Antisense Oligonucleotides (ASO) Therapeutics. *Journal of Controlled Release* **2022**, *352*, 861–878. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.050>.
- (39) Springer, A. D.; Dowdy, S. F. GalNAc-SiRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*. Mary Ann Liebert Inc. June 1, 2018, pp 109–118. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>.

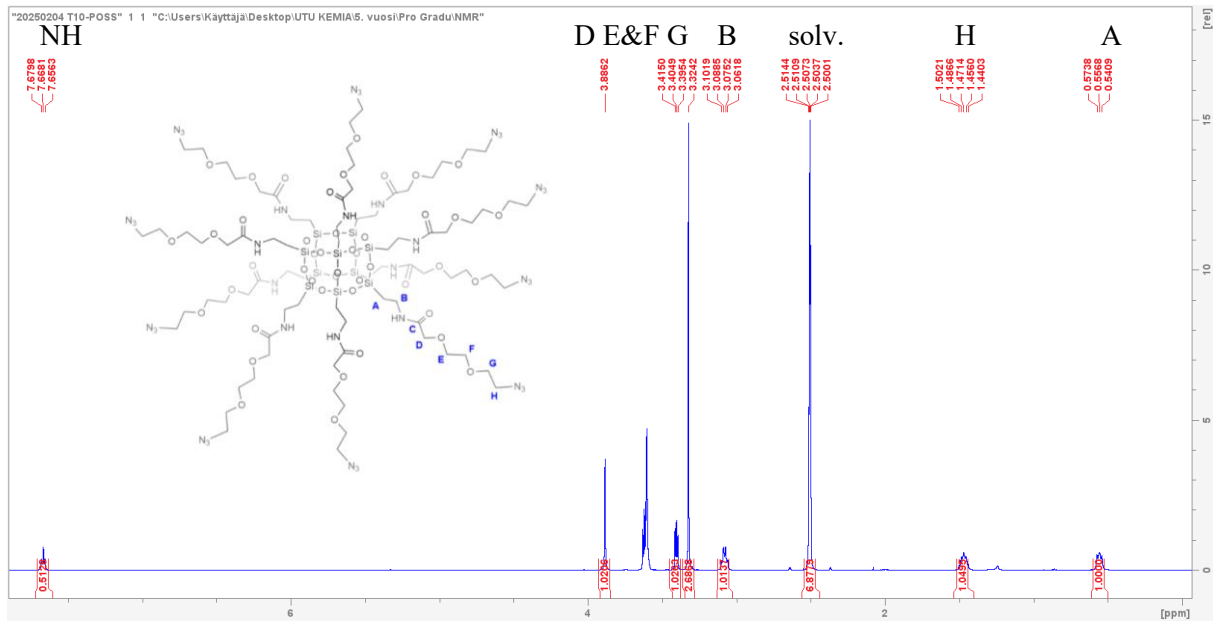
- (40) Nair, J. K.; Willoughby, J. L. S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kelin, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; Oshea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; Van Der Sluis, R. J.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; Van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M. Multivalent N -Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (49), 16958–16961. <https://doi.org/10.1021/ja505986a>.
- (41) Valatabar, N.; Oroojalian, F.; Kazemzadeh, M.; Mokhtarzadeh, A. A.; Safaralizadeh, R.; Sahebkar, A. Recent Advances in Gene Delivery Nanoplatfoms Based on Spherical Nucleic Acids. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd December 1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02648-5>.
- (42) Mohapatra, A.; Uthaman, S.; Park, I.-K. Polyethylene Glycol Nanoparticles as Promising Tools for Anticancer Therapeutics. In *Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics*; Elsevier, 2019; pp 205–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816963-6.00010-8>.
- (43) Kapadia, C. H.; Melamed, J. R.; Day, E. S. Spherical Nucleic Acid Nanoparticles: Therapeutic Potential. *BioDrugs* **2018**, *32* (4), 297–309. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0290-5>.
- (44) Ming, X.; Laing, B. Bioconjugates for Targeted Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *87*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.002>.
- (45) Gilboa, E.; McNamara, J.; Pastor, F. Use of Oligonucleotide Aptamer Ligands to Modulate the Function of Immune Receptors. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19* (5), 1054–1062. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2067>.
- (46) Mirón-Barroso, S.; Domènech, E. B.; Trigueros, S. Nanotechnology-Based Strategies to Overcome Current Barriers in Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG August 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22168537>.
- (47) Cutler, J. I.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acids. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (3), 1376–1391. <https://doi.org/10.1021/ja209351u>.
- (48) Riley, M. K.; Vermerris, W. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. *Nanomaterials*. MDPI AG May 1, 2017. <https://doi.org/10.3390/nano7050094>.
- (49) Barnaby, S. N.; Perelman, G. A.; Kohlstedt, K. L.; Chinen, A. B.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Design Considerations for RNA Spherical Nucleic Acids (SNAs). *Bioconjug Chem* **2016**, *27* (9), 2124–2131. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00350>.
- (50) Callmann, C. E.; Vasher, M. K.; Das, A.; Kusmierz, C. D.; Mirkin, C. A. In Vivo Behavior of Ultrasmall Spherical Nucleic Acids. *Small* **2023**, *19* (24). <https://doi.org/10.1002/sml.202300097>.

- (51) 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* **2009**, *3* (2), 418–424. <https://doi.org/10.1021/nm800726e>.
- (52) Gulumkar, V.; Äärelä, A.; Moisiö, O.; Rahkila, J.; Tähtinen, V.; Leimu, L.; Korsoff, N.; Korhonen, H.; Poijärvi-Virta, P.; Mikkola, S.; Nesati, V.; Vuorimaa-Laukkanen, E.; Viitala, T.; Yliperttula, M.; Roivainen, A.; Virta, P. Controlled Monofunctionalization of Molecular Spherical Nucleic Acids on a Buckminster Fullerene Core. *Bioconjug Chem* **2021**, *32* (6), 1130–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00187>.
- (53) Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.; Zhang, H.; Xi, Z. Comparative Study of Cytotoxicity, Oxidative Stress and Genotoxicity Induced by Four Typical Nanomaterials: The Role of Particle Size, Shape and Composition. *J Appl Toxicol* **2009**, *29* (1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>.
- (54) Attarilar, S.; Yang, J.; Ebrahimi, M.; Wang, Q.; Liu, J.; Tang, Y.; Yang, J. The Toxicity Phenomenon and the Related Occurrence in Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Brief Review From the Biomedical Perspective. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00822>.
- (55) Young, K. L.; Scott, A. W.; Hao, L.; Mirkin, S. E.; Liu, G.; Mirkin, C. A. Hollow Spherical Nucleic Acids for Intracellular Gene Regulation Based upon Biocompatible Silica Shells. *Nano Lett* **2012**, *12* (7), 3867–3871. <https://doi.org/10.1021/nl3020846>.
- (56) Najahi-Missaoui, W.; Arnold, R. D.; Cummings, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci* **2020**, *22* (1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>.
- (57) Melamed, J. R.; Kreuzberger, N. L.; Goyal, R.; Day, E. S. Spherical Nucleic Acid Architecture Can Improve the Efficacy of Polycation-Mediated siRNA Delivery. *Mol Ther Nucleic Acids* **2018**, *12*, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.008>.
- (58) Li, H.; Zhang, B.; Lu, X.; Tan, X.; Jia, F.; Xiao, Y.; Cheng, Z.; Li, Y.; Silva, D. O.; Schrekker, H. S.; Zhang, K.; Mirkin, C. A. Molecular Spherical Nucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (17), 4340–4344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801836115>.
- (59) Cutler, J. I.; Zheng, D.; Xu, X.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A. Polyvalent Oligonucleotide Iron Oxide Nanoparticle “Click” Conjugates. *Nano Lett* **2010**, *10* (4), 1477–1480. <https://doi.org/10.1021/nl100477m>.
- (60) Patel, P. C.; Giljohann, D. A.; Daniel, W. L.; Zheng, D.; Prigodich, A. E.; Mirkin, C. A. Scavenger Receptors Mediate Cellular Uptake of Polyvalent Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles. *Bioconjug Chem* **2010**, *21* (12), 2250–2256. <https://doi.org/10.1021/bc1002423>.
- (61) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Patel, P. C.; Millstone, J. E.; Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. Oligonucleotide Loading Determines Cellular Uptake of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Nano Lett* **2007**, *7* (12), 3818–3821. <https://doi.org/10.1021/nl072471q>.

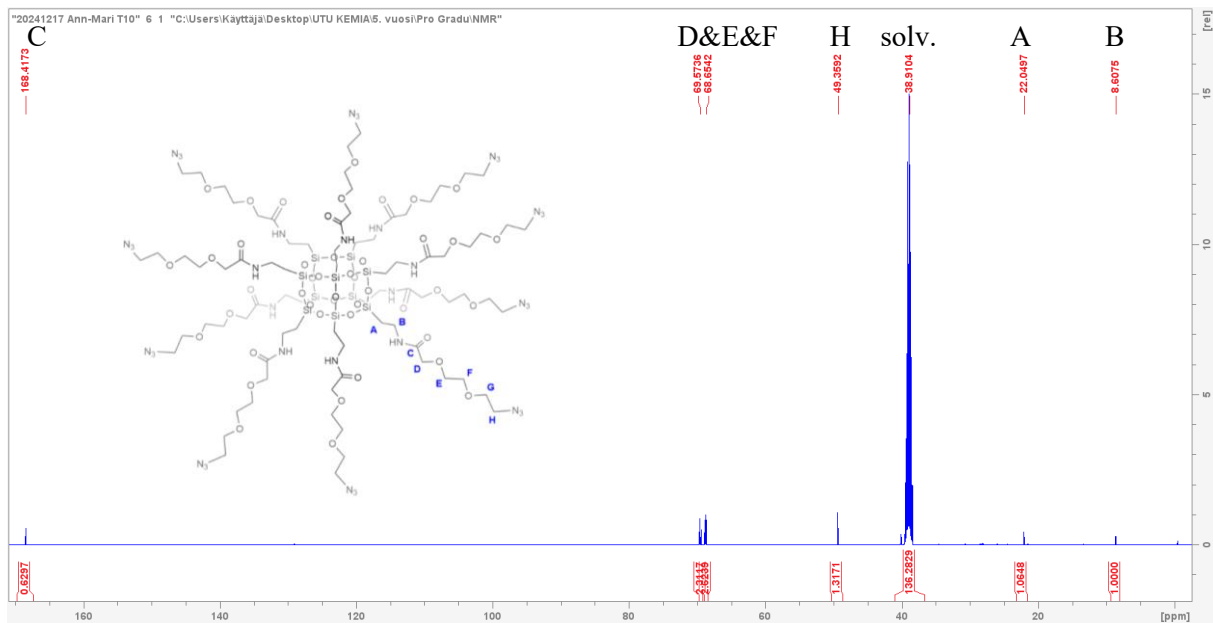
- (62) Holmes, T. R.; Paller, A. S. Gene Regulation Using Spherical Nucleic Acids to Treat Skin Disorders. *Pharmaceuticals*. MDPI AG November 1, 2020, pp 1–19. <https://doi.org/10.3390/ph13110360>.
- (63) Wu, X. A.; Choi, C. H. J.; Zhang, C.; Hao, L.; Mirkin, C. A. Intracellular Fate of Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (21), 7726–7733. <https://doi.org/10.1021/ja503010a>.
- (64) Park, J.; Evangelopoulos, M.; Vasher, M. K.; Kudruk, S.; Ramani, N.; Mayer, V.; Solivan, A. C.; Lee, A.; Mirkin, C. A. Enhancing Endosomal Escape and Gene Regulation Activity for Spherical Nucleic Acids. *Small* **2024**, *20* (11). <https://doi.org/10.1002/sml.202306902>.
- (65) Cheung, T. H.; Shoichet, M. S. The Interplay of Endosomal Escape and RNA Release from Polymeric Nanoparticles. *Langmuir* **2025**, *41* (11), 7174–7190. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c05176>.
- (66) Yamankurt, G.; Stawicki, R. J.; Posadas, D. M.; Nguyen, J. Q.; Carthew, R. W.; Mirkin, C. A. The Effector Mechanism of SiRNA Spherical Nucleic Acids. **2019**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915907117/-/DCSupplemental>.
- (67) Vasher, M. K.; Evangelopoulos, M.; Mirkin, C. A. Transforming Hairpin-like SiRNA-Based Spherical Nucleic Acids into Biocompatible Constructs. *ACS Appl Bio Mater* **2023**, *6* (9), 3912–3918. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00574>.
- (68) Thomas, C. J.; Mirza, R. G.; Gill, M. K. Age-Related Macular Degeneration. *Medical Clinics of North America*. W.B. Saunders May 1, 2021, pp 473–491. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2021.01.003>.
- (69) Streilein, J. W. Ocular Immune Privilege: Therapeutic Opportunities from an Experiment of Nature. *Nature Reviews Immunology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery 2003, pp 879–889. <https://doi.org/10.1038/nri1224>.
- (70) Bachu, R. D.; Chowdhury, P.; Al-Saedi, Z. H. F.; Karla, P. K.; Boddu, S. H. S. Ocular Drug Delivery Barriers—Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases. *Pharmaceutics*. MDPI AG March 1, 2018. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010028>.
- (71) Chong, D. Y.; Anand, R.; Williams, P. D.; Qureshi, J. A.; Callanan, D. G. Characterization of Sterile Intraocular Inflammatory Responses after Intravitreal Bevacizumab Injection. *Retina* **2010**, *30* (9), 1432–1440. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181dc04da>.
- (72) Shen, J.; Durairaj, C.; Lin, T.; Liu, Y.; Burke, J. Ocular Pharmacokinetics of Intravitreally Administered Brimonidine and Dexamethasone in Animal Models with and without Blood-Retinal Barrier Breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2014**, *55* (2), 1056–1066. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13650>.
- (73) Ramsay, E.; Raviña, M.; Sarkhel, S.; Hehir, S.; Cameron, N. R.; Ilmarinen, T.; Skottman, H.; Kjemis, J.; Urtti, A.; Ruponen, M.; Subrizi, A. Avoiding the Pitfalls of SiRNA Delivery to the

- Retinal Pigment Epithelium with Physiologically Relevant Cell Models. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070667>.
- (74) *GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597> (accessed 2025-05-26).
- (75) *Glen Report 19.22: Technical Brief - Procedure for the Synthesis and Deprotection of Synthetic RNA*. DMT-OFF RNA Deprotection. <https://www.glenresearch.com/reports/gr19-22> (accessed 2025-05-26).

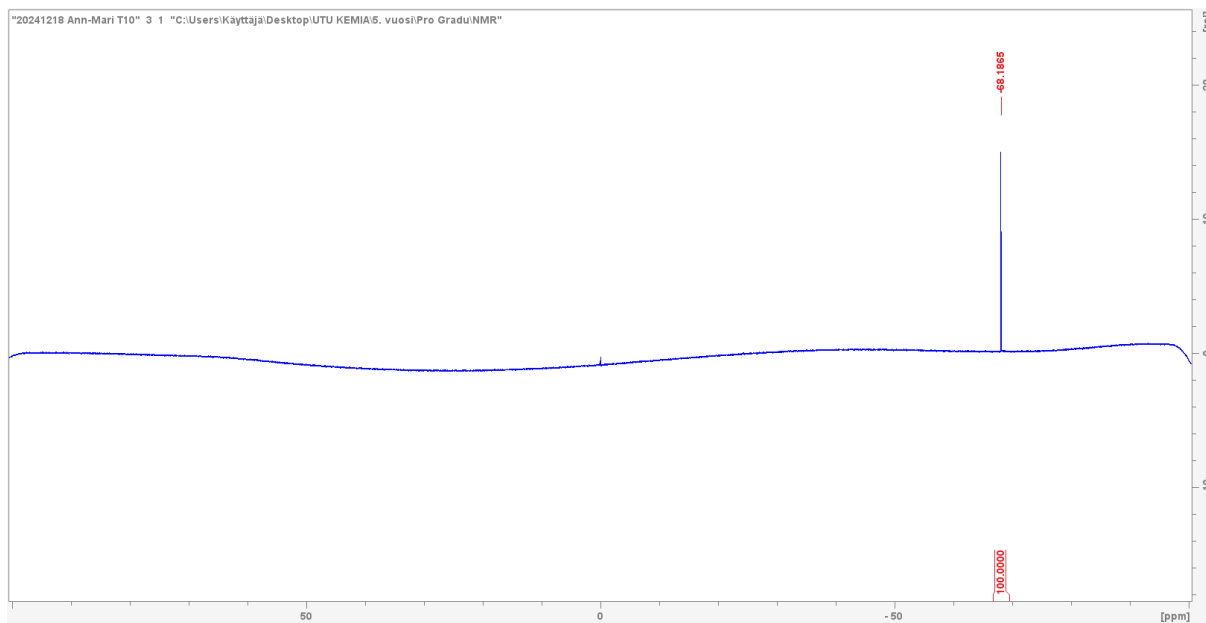
6 Liitteet



Liite 1: T10-COSS-ydinrakenteen 6 ¹H NMR-spektri



Liite 2: T10-COSS-ydinrakenteen 6 ¹³C NMR-spektri



Liite 3: T10-COSS-ydinrakenteen **6** Si-NMR-spektri