



**TURUN
YLIOPISTO**

Vaihtoehtoiset ydinrakenteet molekulaarisille pallonukleiinihapoille

Kemian laitos, Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

Pro gradu -tutkielma

Laatija:

Julia Korva

17.01.2024

Turku

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

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Bio-orgaaninen kemia

Tekijä(t): Julia Korva

Otsikko: Vaihtoehtoiset ydinrakenteet molekulaarisille pallonukleiinihappoille

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

Sivumäärä: 40 sivua

Päivämäärä: 17.01.2024

Nanolääketiede hyödyntää nanokoon rakenteiden kemiallisia sekä fysikaalisia ominaisuuksia erilaisissa sovellutuksissa. Nanorakenteiden muotoa, kokoa ja pinnan kemiallisia ominaisuuksia voidaan hallita ja muokata tarkasti. Nanosysteemeihin voidaan sisällyttää komponentteja, joita voidaan hyödyntää muun muassa geenien kuljetukseen, lääkeannosteluun sekä sairauksien hoitoon. Esimerkkejä nanokoon rakenteista ovat pallonukleiinihapot (SNA:t), jotka voivat kuljettaa oligonukleotideja kohdesoluihin. Oligonukleotidien käyttöä rajoittaa niiden heikkoudet *in vivo*; nopea erittyminen ja huono stabiilisuus. Nämä heikkoudet voidaan välttää kehittämällä nanokoon lääkeaineen kuljetusjärjestelmiä, jotka hallitusti vapauttavat lääkeainetta aiheuttaen mahdollisimman vähän toksisuutta.

Pallonukleiinihapot koostuvat sopivasta ydinrakenteesta ja sen ympärille kootusta tiheästä oligonukleotidikuoresta. Pallonukleiinihappojen ydinrakenteen valinnalla on merkitystä sen ominaisuuksiin sekä kestävyYTEEN. Ydinrakenteet voivat olla epäorgaanisia tai orgaanisia. On myös mahdollista, että pallonukleiinihapon ydin on ontto. SNA-rakenteet omaavat monia hyödyllisiä ominaisuuksia verrattaessa lineaarisiin oligonukleotideihin, kuten alhaisemman sytotoksisuuden, nukleasiresistenssin, pienemmän immuunivasteen sekä tehokkaan soluunoton *scavenger A*-reseptorien välityksellä.

Molekulaaristen pallonukleiinihappojen rakenne on tunnettu ja määritelty, jolloin sen kokoa ja oligonukleotidien lukumäärää voidaan säädellä kontrolloidusti. Aikaisemmissa tutkimuksissa on käytetty 12-haaraista C₆₀-fullereenia ydinrakenteena. Tässä työssä tutkitaan vaihtoehtoisten biohajovien ja muokattavien ydinrakenteiden soveltuvuutta pallonukleiinihappojen valmistukseen. Ydinrakenteena käytetään helposti saatavilla olevia ydinrakenteita: 4-haaraista ja 8-haaraista polyamidoamiini (PAMAM) dendrimeeriä sekä 8-haaraista silseskvioksaania. Ydinrakenteisiin kiinnitetään atsidi-modifioitu käsivarsirakenne, jolloin oligonukleotidisekvenssi voidaan kiinnittää rengasjännityksen ajamalla alkyyni-atsidi-sykloadditioreaktiolla (SPAAC). Synteesein jälkeen lopullisena tavoitteena on selvittää ydinrakenteiden sekä oligonukleotidien vaikutusta pallonukleiinihappojen soluunottoon *in vitro* ja biodistribuition *in vivo*.

Oligonukleotidisynteetit onnistuivat hyvin ja ne saatiin karakterisoitua massaspektrometrisesti. Onnistuneesti valmistettiin PAMAM G1-ydinrakenne SNA-synteesiä varten. POSS- sekä PAMAM G1-ydinrakenteen monofunktionalisointi oligonukleotidilla onnistui, mutta ydinrakenteiden valmiita SNA-tuotteita (24 oligonukleotidijuostetta/ydinrakenne) ei saatu valmistettua. Saadut tuotteet olivat seoksia, joissa oligonukleotidiketjujen määrät vaihtelivat. Haaroitusrakenteen takia oligonukleotidikuori on tiheämpi kuin yksittäisillä oligonukleotidijuosteilla, jolloin ydinrakenteeseen jää vapaita haarakkeita oligonukleotidikuoren suojaan. Monofunktionalisoinnissa 3-haaraisen oligonukleotidin korvaaminen yhdellä oligonukleotidijuosteella mahdollistanees täysfunktionalisoidun SNA:n synteesin.

Avainsanat: Pallonukleiinihapo, SNA, PAMAM-dendrimeerit, polyoktaedrinen silseskvioksaani, POSS, COSS

Sisällysluettelo

1	Johdanto	6
1.1	Pallonukleiinihapot	6
1.1.1	Rakenne ja ominaisuudet	7
1.1.2	Ydinrakenteita	9
1.1.3	Pinnan tiheys	12
1.2	PAMAM-dendrimeerit	14
1.2.1	Rakenne ja ominaisuudet	15
1.2.2	Synteesireitit	17
1.2.3	Sovellutukset	20
1.3	Työn tarkoitus	21
2	Tulokset ja niiden tarkastelu	23
2.1	Fosforotioaattioligonukleotidit	23
2.2	Käsivarsirakenteen (11) synteesi	24
2.3	SNA-synteesit	24
2.3.1	Synteesien suolapitoisuudet	25
2.3.2	POSS-ydinrakenteena	27
2.3.3	PAMAM G1 -ydinrakenteena	30
3	Kokeelliset menetelmät	33
3.1	Yleiset menetelmät	33
3.2	Oligonukleotidin ON2 synteesi	33
3.3	Oligonukleotidin ON4 synteesi	34
3.3.1	Tetraetyleeniglykolin (16) tritylointi	34
3.3.2	Välituotteen 18 fosfitylointi	35
3.3.3	ON4 synteesi	36
3.4	Käsivarsirakenteen (11) synteesi	37
3.4.1	2-[2-(2-hydroksietoksi)etoksi]etyyli-4-metyylibentseenisulfonaatin (9) synteesi	37
3.4.2	2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etanolin (10) synteesi	38
3.4.3	2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etaanin (11) synteesi	39
3.5	PAMAM G1 -ydinrakenteen synteesi	39
3.6	SNA-synteesit	41
3.6.1	PAMAM G1 -ydinrakenne	41
3.6.2	POSS-ydinrakenne	43

4 Johtopäätökset	45
Lähteet	46
Liitteet	57

Lyhenneluettelo

SNA	Pallonukleiinihappo
AuNP	Kultananopartikkeli
PEG	Polyetyleeniglykoli
COSS	Silseskvioksaani häkkirakenne (eng. <i>octahedral cubic silsesquioxane</i>)
POSS	Silseskvioksaani häkkirakenne (eng. <i>polyhedral oligomeric silsesquioxane</i>)
PAMAM	Polyamidoamiini
SPAAC	Rengasjännityksen ajama alkyyni-atsidi-sykloadditio (eng. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>)
MMT	Monometoksitriityyli
DBCO-TEG	Dibentsosyklo-oktyyli – trietyleeniglykoli
EDA	Etyleenidiamiini
TEAA	Trietyyliammoniumasettaatti
ACN	Asetonitriili
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
BCN-NHS	[(1R, 8S, 9s)-bisyklo[6,1,0]non-4-yyini-9-yyli]metyyli-N-sukkinimidyylikarbonaatti
BCN	bisyklo[6.1.0]non-4-yyini
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DMTrCl	4,4'-Dimetoksitriitylikloridi
DCM	Dikloorimetaani
TLC	Ohutlevykromatografia
TEA	Trietyyliamiini
TFA	Trifluoretikkahappo
BOP	[(1H-bentso[d][1,2,3]triatsol-1-yyli)oksi]tris(dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorofosfaatti

1 Johdanto

1.1 Pallonukleiinihapot

Nanolääketiede on nanoteknologian lääketieteellinen sovellutus, joka hyödyntää nanokoon rakenteiden kemiallisia sekä fysikaalisia ominaisuuksia diagnostisiin sekä terapeuttisiin tarkoituksiin.¹ Nanorakenteiden muotoa, kokoa ja pinnan kemiaa voidaan hallita ja muokata tarkasti.² Lisäksi nanosysteemeihin voidaan sisällyttää komponentteja, joita voidaan käyttää biolääketieteellisiin sovellutuksiin, kuten geenien kuljetukseen, lääkeannosteluun sekä sairauksien hoitoon.³ Nanolääkeainekuljettimina on tutkittu useita erilaisia rakenteita, kuten liposomeja⁴, hiilinanoputkia⁵, nanokristalleja, polymeerisiä nanopartikkeleita, kultananopartikkeleita sekä dendrimeerejä.⁶

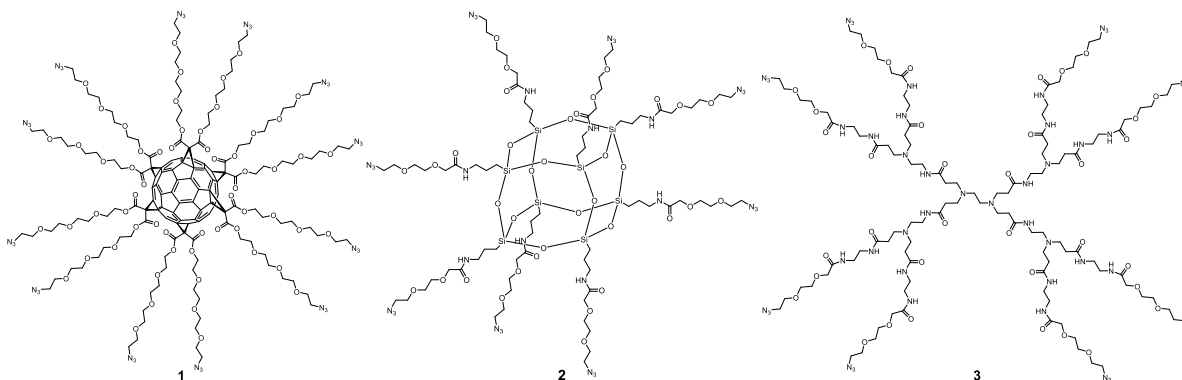
Oligonukleotideja käytetään terapeuttisena aineena geneettisen tiedon siirtoon, kuljetukseen ja muokkaamiseen geeniterapiassa ja virusoidossa.⁷ Niiden käyttöä kuitenkin rajoittaa niiden heikkoudet systeemisessä annostelussa; nopea erittyminen ja huono pysyvyys. Tätä voidaan parantaa kehittämällä nanokoon lääkeaineen kuljetusjärjestelmiä DNA:lla sekä RNA:lla, jotka parantavat nukleiinihappojen biodistributiota ja mahdollisesti kohdentavat nukleiinihapon haluttuun kudokseen. Nanokuljettimet voivat vaikuttaa suotuisasti immunogeenisuuteen ja toksisuuteen.⁸

Pallonukleiinihapot (SNA, *eng. spherical nucleic acids*) ovat kolmiulotteisia nanokoon kuljettimia ja helposti muokattavia rakenteita, joilla on useita etuja verrattuna lineaarisiin oligonukleotideihin. Huolimatta pallonukleiinihappojen negatiivisesta pintavarauksesta, pääsevät ne solun sisään nopeammin mitä lineaariset oligonukleotidit, *scavenger A*-reseptorivälitteisen endosytoosin avulla.⁹ Tämän ominaisuuden ansiosta on mahdollista kuljettaa suuria määriä nukleiinihappoa soluihin ilman ulkoisia transfektioagensseja.^{10,11} Lisäksi SNA:illa on pienempi synnynnäisen immuunivasteen aktivointi¹² ja korkeampi sitoutumisaffiniteetti¹³ sekä ne pystyvät vastustamaan nukleasiin hajotusta paremmin¹⁴. SNA:iden on todettu läpäisevän jopa veri-aivoesteen lineaarisia oligonukleotideja paremmin.¹⁵ Verrattaessa muihin geenin kuljetusjärjestelmiin SNA:lla on vähäinen immunogeenisuus toisin kuin esimerkiksi liposomeilla.^{16,17} Näiden etujen ansiosta voidaan SNA:ta hyödyntää geenieksperssion säätelyssä¹⁸, kemoterapiassa¹⁹, immunomodulaatiossa²⁰ sekä DNA:n ja RNA:n havaitsemisessa *in vitro*^{21,22,23}.

SNA-rakenteilla on paljon potentiaalia toimia monissa lääketieteellisissä sovellutuksissa. Kuitenkin on tarpeellista tutkia SNA-rakenteen pysyvyyttä sekä solun että kudosten sisällä kuin myös elimissä. Lisäksi eri ytimien ja oligonukleotidien vaikutusta SNA-rakenteen pysyvyyteen tulee tutkia tarkemmin. Kultananopartikkeli-SNA:iden (AuNP-SNA) on osoitettu lisäävän DNA:n pysyvyyttä deoksiribonukleaasia vastaan. SNA:iden biodistributioon vaikuttavia tekijöitä ei tunneta kovin hyvin. Tutkimukset keskittyvät niiden muotoon ja kokoon, mutta niiden lisäksi mahdollisia tutkimuksen kohteita voivat olla SNA ytimen vaikutus tiheyteen. Lisäksi SNA:iden vuorovaikutusta immuunijärjestelmän kanssa ei ole havainnollistettu eikä kovin hyvin tunneta, miten nukleiinihapporyhmittymät metabolisoituvat ja miten ne käsitellään *in vivo*.⁸

1.1.1 Rakenne ja ominaisuudet

SNA-rakenne koostuu ydinrakenteesta sekä siihen kiinnittyneistä muokatuista oligonukleotidijuosteista, jotka muodostavat tiheän oligonukleotidikuoren.²⁴ Molekulaaristen pallonukleiinihappojen rakenne on tarkoin kontrolloitavissa ja muunneltavissa toisin kuin polydisperseillä SNA-rakenteilla, joissa oligonukleotidikuoren tiheydet vaihtelevat.²³ Molekulaarisella SNA:lla ydinrakenne voi olla esimerkiksi C₆₀ (**1**), POSS (**2**) tai sukupolven 1 PAMAM-dendrimeeri (**3**) (Kuva 1).



Kuva 1. Molekulaaristen SNA:iden ydinrakenteet: C₆₀-fullereeni (**1**), POSS (**2**) ja PAMAM G1 (**3**).

Pallonukleiinihappojen kuoren oligonukleotidit, voivat olla yksi-, kaksi tai kolmejuosteisia konjugaatteja. Valitut konjugaatit vaikuttavat SNA:n ominaisuuksiin. Rosi *et al.* tutkimusryhmä on ensimmäisenä osoittanut käyttämällä yksijuosteista DNA:ta, että SNA:t pääsevät soluihin sisään ja voivat säädellä geenin ilmentymistä.¹⁸ SNA-rakenteissa on käytetty myös kaksijuosteista DNA-²⁵, siRNA-²⁶ sekä miRNA-konjugaatteja²⁷. Mirkin *et al.* ovat osoittaneet, että muokkaamalla nukleiinihapposekvenssejä saadaan aikaan merkittävä muutos SNA:n pinnan proteiinikoronaan.²⁸

SNA:n ytimen ympärillä oleva tiheä kuori koostuu yleensä kolmesta toiminnallisesta osasta, joita ovat kiinnitysosa ytimeen (käsivarsi), välikappale (eng. *spacer*) sekä hallittava toiminnallinen sekvenssialue.²⁵ Nämä kolme osaa vaikuttavat oligonukleotidikonjugaatin toimintaan ja niiden valinnalla voidaan vaikuttaa esimerkiksi SNA:n pysyvyyteen.⁸ Ytimeen kiinnittyvä osa sitoutuu ytimeen joko kovalenttisella tai ei-kovalenttisella sidoksella ja sopiva kiinnitysosa riippuu valitusta ytimeestä. Esimerkiksi AuNP-ytimen kiinnitysosan yksittäinen molekyyli on yleensä joko propyyli- tai heksyyliolioliryhmä, joka liitetään oligonukleotidiin osana automatisoitua kiinteän kantajan synteesiä.^{25,29,30} SNA-konjugaatin pysyvyyttä voidaan monitoroida, kun seurataan oligonukleotidien funktionalisointia ditiotreitililla, eli disulfididoksien pelkistäjällä.³¹ Muita käytettyjä kiinnitysosia epäorgaanisilla ytimillä ovat amiinit ja karboksyylihapot sekä kelaatit, joita voivat olla haarautuneet tiolirakenteet³² tai sykliset disulfidirakenteet^{31,33}. Orgaanisilla ytimillä kiinnitysosana voidaan käyttää orgaanisia ligandeja kuten tokoferolin osaa tai dibentsosyklo-oktyyniamiinia.^{8,23}

Toisen kuoren osan, välikappaleen (eng. *synthon*), avulla hallittava toiminnallinen alue on kauempana ytimen pinnasta (esimerkiksi AuNP-pinnasta). Välikappale voi koostua PEG-yksiköistä sekä myös oligonukleotidista: T₁₀ tai A₁₀.³⁴ Välikappaleiden avulla ytimien ympärille saadaan alueita, jotka vähentävät suolan aiheuttamaa aggregaatiota. Tämän ansiosta on mahdollista parantaa SNA:n joustavuutta sekä pysyvyyttä ja lisäksi lisätä konjugoitujen oligonukleotidien tiheyden määrää kuorella.³⁵ Tutkimuksissa on osoitettu lisääntyneen PEGylaation pidentävän SNA:iden puoliintumisaikaa (T_{1/2}) verenkierrassa hiirillä.³⁶

Kolmas osa on hallittava toiminnallinen sekvenssialue, joka voidaan muokata tarkoitusta varten sopivaksi. Oligonukleotidien ryhmittymä SNA:n pinnalla määrittää biologisen käyttäytymisen, kun SNA on vuorovaikutuksessa solujen ja elinten kanssa *in vitro* sekä *in vivo*.^{37,38} Sekvenssialue on aktiivinen alue, jota voidaan hyödyntää emäsparien muodostukseen muiden juosteiden kanssa. Ytimen pinnalla olevien oligonukleotidien lukumäärä pystytään ennustamaan kaarevuuden, muodon ja vapaan pinta-alueen funktiona. Ulkokuori voi sisältää erilaisia konjugaatteja, esimerkiksi kuvantamisaineita (fluoreseiini, radioisotooppi ¹⁸F tai MRI-varjoaineet) ja immunostimulantteja (antigeeni, vasta-aine tai tehosteaine CpG).⁸ SNA voi koostua myös kaksoiskierteisestä RNA:sta (siRNA), joka voi RNA-interferenssin kautta vaikuttaa solujen jakautumiseen, kasvuun, erilaistumiseen ja apoptoosiin.³⁶

DNA ja RNA:iden lisäksi nukleiinihappoketjuun voidaan tehdä erilaisia muokkauksia, kuten käyttää neutraaleja oligonukleotidianalogeja: peptidinukleiinihappoja (PNA)³⁹ tai morfolino-

oligonukleotideja (MPO)⁴⁰. Neutraalien oligonukleotidianalogien etuna on vahvempi hybridisaatio, erinomainen pysyvyys ja ne pariutuvat vahvemmin kuin negatiivisesti varautuneet DNA-konjugaatit.⁴¹ Muita muokattuja nukleiinihappoja ovat lukitut nukleiinihapot (LNA), jotka nekin lisäävät rakenteiden pysyvyyttä ja sitoutumisvoimakkuutta kohteisiin.⁸ Seferos *et al.* tutkimuksessa lisättiin neljä LNA-emästä sekvenssiin. Kun konjugaattien kohteena oli surviviini geeni, saatiin geenin ”*knockdown*”, eli geenin ilmentymisen vähentyminen, kasvamaan 66,6 % A549-syöpäkohdesoluissa.⁴² McKenzie *et al.* ovat osoittaneet, että AuNP-ytimeen kiinnittyneet LNA-konjugaatit voivat nostaa kaksoiskierteen sulamislämpötilaa noin 3 °C yhtä LNA-emästä kohden.⁴³

1.1.2 Ydinrakenteita

Ensimmäiset raportoidut pallonukleiinihapot syntetisoitiin vuonna 1996 Mirkin *et al.* tutkimusryhmässä, jolloin SNA:n ytimenä käytettiin kultananopartikkeleita (AuNP).²⁴ Tämän jälkeen ydinrakenteena on käytetty useita erilaisia rakenteita, epäorgaanisia, orgaanisia sekä onttoja ytimiä.⁸ Ytimen valinnalla on merkitystä SNA:n ominaisuuksiin: kokoon, muotoon ja biologiseen profiiliin.²⁵ Ytimet jäävät usein soluun, kun taas oligonukleotidit poistetaan vähitellen solusta.⁴⁴ Tästä syystä bioyhteensopivat ja biohajoavat ydinrakenteet ovat tärkeässä roolissa ydinrakenteen valinnassa ja kehityksessä.⁸

Ontto ydin saavutetaan syntetisoimalla ensin AuNP-ydinrakenteinen SNA, jonka jälkeen ytimen ympärille syntetisoidaan ristosilloitettu tiheä kuori. AuNP-ytimen kulta liuotetaan kaliumsyaniidilla, jolloin tuotteena saadaan onttoytiminen SNA.⁴⁵ Ontto ydin voidaan valmistaa myös piidioksidista⁴⁶. Ontot SNA-rakenteet omaavat samankaltaiset ominaisuudet kuin muutkin SNA:t. Alhainen sytotoksisuus, resistanssi nukleasia kohtaan sekä tehokas geenin säätely ovat tyypillisiä kaikille SNA:ille. Lisäksi voidaan välttää ydinrakenteen kontaminoituminen soluun.⁴⁵

Onttojen ytimien lisäksi SNA:ssa voidaan käyttää epäorgaanisia ytimiä. Niitä ovat kvanttipisteet (QD), rautaoksidi sekä jo mainitun kullan lisäksi muut jalometallinanopartikkelit: hopea, palladium ja platina.⁴⁷ Ensimmäinen SNA syntetisoitiin päällystämällä 13 nm halkaisijaltaan oleva AuNP merkaptomodifioidulla DNA:lla. AuNP-ytimelliset SNA:t ovat tutkituin SNA-ryhmä, jossa ytimeen on kiinnitetty Au-S-sidoksella alkyylitiolilla muokatut oligonukleotidit.^{24,32} Kultananopartikkeleilla on eri etuja: niillä voidaan syntetisoida useita erikokoisia hiukkasia.⁴⁸ Lisäksi niihin liittyvä analytiikka on suoraviivaista.²⁵

Kullan lisäksi muilla nanohiukkasilla on ominaisuuksia, jotka vaikuttavat SNA:han. Esimerkiksi vesiliuoksessa hopeananopartikkelit hapettuvat helposti⁴⁹, jolloin yksihampaisista alkyylitioleista on vaikea valmistaa pysyviä konjugaatteja.²⁵ Tästä syystä AgNP-ytimellisissä SNA:issa käytetään oligonukleotideja, joissa on useita syklisiä disulfidiryhmiä, jotka estävät hopean hapettumisen.⁵⁰ Vaihtoehtoisesti AgNP-prismoja voidaan muokata päällystämällä ne ensin silikakerroksella ja sitten muokkaamalla pintaa alkoksisilaanilla esimerkiksi oktadekyylitrimetoksisilaanilla.⁵¹ Kadmiumselenidi kvanttipisteet valmistetaan kolmivaiheisella menetelmällä, jossa ligandin ja liuottimen vaihdon jälkeen suoritetaan lopuksi inkubointi alkyylitiofunktionalisoitujen oligonukleotidien kanssa.⁵² Vaihtoehtoinen menetelmä on käyttää tiolireaktiiviseksi muokattua peptidikäsivarsirakennetta kiinnitysryhmänä, kun polyhistidiini-reaktiivinen-peptidi sitoutuu kvanttipisteisiin metalli-histidiini-vuorovaikutuksilla.⁵³ Kuparivapaalla rengasjännityksen ajamalla alkyyniatsidi-sykloadditiolla (SPAAC)⁵⁴ on valmistettu SNA, jonka ytimenä on käytetty superparamagneettista rautaoksidinanohiukkasta (SPION).⁵⁵ Näiden konjugaattien DNA-sitoutumiskäyttäytyminen on lähes identtistä riippumatta ytimen materiaalista.²⁵

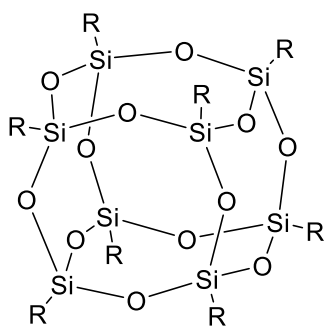
Epäorgaaniset rakenteet ovat yleisin valinta SNA:n ytimeksi. Niiden haittana ovat kuitenkin mahdolliset pitkäaikaismyrkyllisyshaitat sillä ne kerääntyvät elimiin muun muassa maksaan ja pernaan.⁵⁶ Tästä syystä biohajoavilla ja bioyhteensopivilla ytimillä, esimerkiksi liposomeilla, on potentiaalia biolääketieteen sovellutuksiin. Orgaanisia ytimiä ovat liposomien⁵⁷ lisäksi proteiinit⁵⁸, polymeerit⁵⁹ sekä joukko muita molekyyliä. Liposomaalisten SNA:iden (LSNA) synteesissä aluksi syntetisoidaan ydin lipidimonomeereistä, jonka pinnalle kiinnitetään nukleiinihappojohdannainen, jossa on hydrofobinen tokoferoli. LSNA:n lipidirakenneosat määrittävät pysyvyyden, DNA-juosteiden maksimimäärän kuorella, soluunoton, immuunivasteen *in vitro* sekä kerääntymisen imusolmukkeisiin *in vivo*.⁵⁷

Proteiinia, esimerkiksi β -galaktosidaasia, voidaan käyttää ytimenä, kun siihen kiinnitetään kovalenttisesti atsidikäsivarsirakenne. Muokattuun proteiiniyttimeen kiinnitetään kuparivapaalla klik-kemialla DNA-juosteita, jolloin saadaan tuotteena proteiini-SNA (pro-SNA). Entsyymien soluunottoa parantaa kovalenttisesti tiheä oligonukleotidikuori ja synteeseissä voidaan käyttää alhaisia entsyymipitoisuuksia (jopa 100 pM).⁵⁸ Pro-SNA:sta ja laktaattioksideasi-ytimeistä voidaan koota ristisilloitettuja nanohiukkasia, joilla on Pro-SNA:ta tehokkaampi solujen kuljetus sekä parempi signaali-kohinasuhde, kun seurataan solunsisäistä laktaattia.⁶⁰

SNA:n ydinrakenteena on onnistuttu käyttämään myös DNA:ta. Ydinrakenne syntetisoidaan DNA-osista *rolling-circle replication* -menetelmällä (RCR), jolloin saadaan nanokukka DNA-rakenne.⁶¹ Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää DNA *rolling-circle amplification* -menetelmää (RCA), jolloin saadaan kerämäinen DNA muoto (DNA nanokerä, DC). Ytimen ympärille saadaan useita kopioita siRNA-duplekseista, kun ne kiinnittyvät kerän ympärillä oleviin komplementaarisiin sekvensseihin. Emäspariutumisen seurauksena saadaan siRNA-DC SNA-rakenne. siRNA-DC-SNA otetaan soluun sisälle *Scavenger A*-reseptorivälitteisesti, jossa se pilkotaan niin, että siRNA vapautuu ytimestä. Ydin mahdollistaa kohdennetun siRNA-välitteisen geenin hiljentämisen.⁶²

C₆₀-fullereenia on käytetty ydinrakenteena pallonukleiinihappojen synteeseissä^{23,63}. Polyoktaedrinen silseskvioksaani (POSS) on vaihtoehtoinen ydinrakenne tälle, sillä se on edullisempi sekä biohajoava. Kuitenkin Li *et al.* osoittivat C₆₀-fullereeni SNA:lla olevan parempi soluunotto sekä parempi nukleasiresistenttisyys kuin vastaavalla POSS-SNA:lla, koska 12-haaraisen C₆₀-ytimen oligonukleotidi kuori on tiheämpi kuin 8-haaraisen POSS-ytimen.²³

Yleistermi silseskvioksaani kuvaa kaikkia rakenteita, joiden empiirinen kaava on RSiO_{3/2}, jossa R on esimerkiksi vety, alkyyli tai aryyli. Rakenne voi olla tikapuu-, osittainen häkki-, häkki (**4**)-tai satunnainen rakenne. Silseskvioksaanin häkkirakenne (**4**) (Kuva 2), eli POSS (eng. *octahedral cubic silsesquioxane*) tai toiselta nimeltään COSS (eng. *polyhedral oligomeric silsesquioxane*), on kolmiulotteinen nanorakenne (halkaisijaltaan 0,53 nm), jossa piiatomiin on kovalenttisesti sitoutunut kolme happiatomia.⁶⁴ POSS-nanorakenne on epäorgaaninen-organinen rakenne. Häkkirakenteen pinnan orgaanisten ryhmien ansiosta rakenne voidaan tehdä yhteensopivaksi esimerkiksi polymeerien tai biologisten järjestelmien kanssa. Ryhmät on mahdollista suunnitella reaktiivisiksi tai ei-reaktiivisiksi.⁶⁵



4

Kuva 2. SNA:n ytimenä käytettävä silseskvioksaanin häkkirakenne (4), jossa R voi olla H tai jokin muu atomi.

Käytetyn ydinmateriaalin muoto ja koko määrittelevät maksimaalisen oligonukleotiditiheyden SNA:n pinnalla.⁶⁶ 10 nm halkaisijan kokoinen AuNP-ytimellä voi olla 3,5 kertaa enemmän oligonukleotidijuosteita kuorella kuin saman pinta-alan tasaisella kultalevyllä. Ytimen koko määrittää myös kaarevuuden, mitä pienempi ydin sen suurempi kaarevuus.⁶⁷ Lisäksi ytimillä on säädeltäviä optisia ominaisuuksia sekä kestäväää katalyyttistä pysyvyyttä.⁶⁸ Eri analyytteihin sitoutuneet AuNP-ytimet luovat pintaplasmoniresonanssia (SRP) ja tehostavat näin pinnan Raman-sirontaa.⁶⁹ Tämä johtaa herkkään biotunnistukseen ja signaalin lisäykseen, joita voidaan hyödyntää biolääketieteellisissä sovellutuksissa.^{69,70}

1.1.3 Pinnan tiheys

SNA-konjugaatteja voidaan hyödyntää erilaisissa sovellutuksissa diagnostiikassa ja terapiassa. Nanopartikkelien pinnalla olevien oligonukleotidien rakenteeseen ja tiheyteen vaikuttaa DNA-nanopartikkelikonjugaatin pysyvyys sekä toiminta. Tämän yhteyden vuoksi on tärkeää ymmärtää tekijät, jotka vaikuttavat konjugaattien muodostumiseen, jotta voidaan suunnitella tarkoitukseensa optimoituja ja hyvin määriteltyjä konjugaatteja. Tekijät, jotka vaikuttavat SNA-konjugaatteihin ovat suolan konsentraatio synteesissä, käytetyn nanopartikkelin koko sekä muoto, SNA:n pinnan lähettyvillä olevat emäkset, ultraäänikäsittely³⁴ ja lämmitys^{34,25}.

Ensimmäiset syntetisoidut Au-NP-konjugaatit olivat 13 nm pituisia Au-NP sitraattistabiloituja konjugaatteja, joihin kiinnitettiin alkyylitiolilla lyhyitä oligonukleotideja esimerkiksi 3'-propyylioli-TACCGTTG-juosteita.²⁴ Nämä muodostuneet SNA:t eivät olleet pysyviä kuin viikkojen ajan, koska DNA on negatiivisesti varautunut ja tällä menetelmällä ei pystytty SNA:n kuorta pakata tiheästi. Tämän jälkeen kehitettiin menetelmä, jossa valmistetaan suolauksen avulla tiheitä ja pysyvämpiä SNA-rakenteita.⁷⁰ Tyypillisesti suolan konsentraatio liuoksessa on noin 0,15 M – 1 M.²⁵ Kun reaktioliuoksen suolakonsentraatiota lisätään, saadaan aikaan

vierekkäisten juosteiden välisiä hylkiviä vuorovaikutuksia ja siten suurempia kuoren pinnan oligonukleotiditiheyksiä. Lopulta steeriset rajoitukset määrittävät maksimitiheyden oligonukleotideille. Suolalla ikäännyttämällä Au-NP-ytimen oligonukleotidien kuori on pysyvä Au-S-vuorovaikutusten ansiosta verrattuna heikompiin Au-sitraatin vuorovaikutuksiin.²⁵ Ytimen kuorella olevien oligonukleotidien muodostama negatiivinen varaus antaa korkean negatiivisen elektrokineettisen potentiaalin (alle 30 mV) kolloidisessa seoksessa, joka vähentää saostumista.⁷¹ Tämän menetelmän käyttö on osoittanut SNA:iden olevan pysyviä kuukausien ajan erilaisissa pH-, liuotin ja ionivahvuusolosuhteissa. Kuitenkin DNA:n dissosiaatiota on myös havaittu hieman huoneenlämmössä.^{18,72} Rakenteen pysyvyys on tärkeää, kun niitä käytetään sovellutuksissa kuten solun sisäisessä geeninsäätelyssä sekä molekyyli diagnostiikassa *in vitro*.²⁵

Suurin DNA:n maksimipintatiheys riippuu siis ytimen koosta ja muodosta. Pallomaisilla pienemmällä hiukkasilla, kuten AuNP, maksimipintatiheys on suurempi kuin suuremmilla hiukkasilla sekä tasomaisilla hiukkasilla. Esimerkiksi 10 nm pallomaisilla AuNP-hiukkasilla maksimitiheys on usein noin 2×10^{13} oligoa/cm², kun taas identtisissä olosuhteissa tasomaisilla AuNP-hiukkasilla maksimitiheys on $5,8 \times 10^{12}$ oligoa/cm². Kuten aiemmin mainittu, pienemmän ytimen ansiosta SNA-rakenteella on suurempi kaarevuuskulma, jolloin yksittäisen juosteen ympärillä on enemmän tilaa. Siitä syystä usein pienempään ytimeen voi kiinnittyä suhteessa suurempi määrä oligonukleotideja kuin suuremmalla ytimellä. Au-NP-ytimen koon kasvaessa tämä vaikutus vähenee. Kun halkaisija on ≥ 200 nm, oligonukleotidin tiheys pinnalla lähenee samaa kuin tasomaisella kultananopartikkelilla.⁶⁷

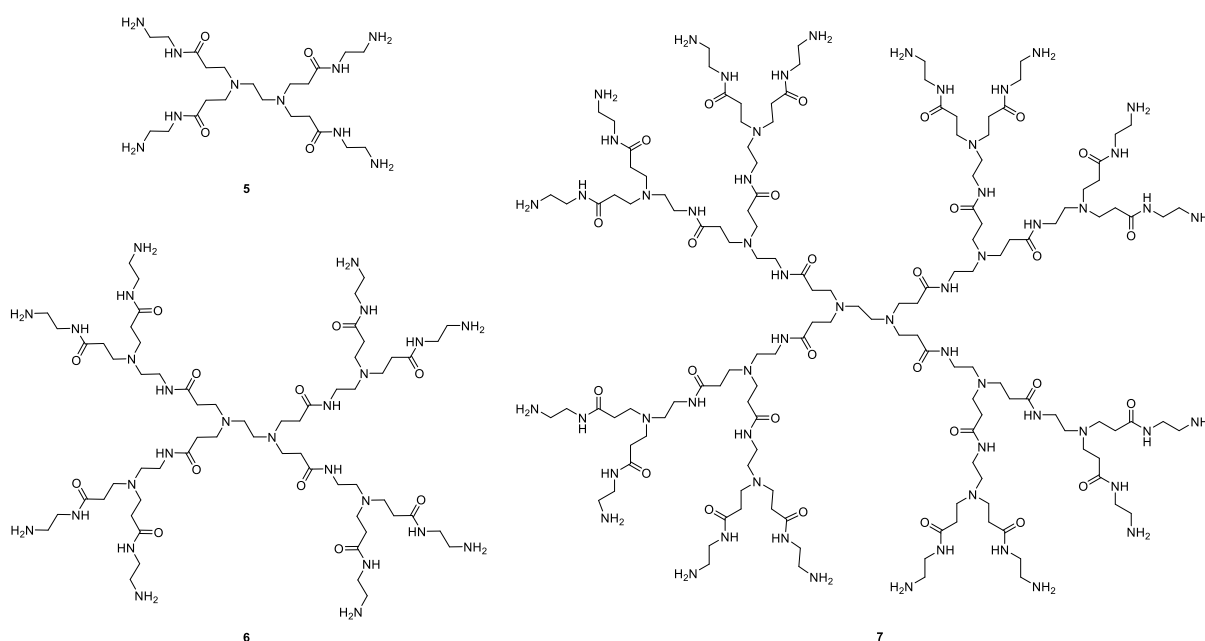
Lisäksi ytimen lähellä olevat DNA-emäkset vaikuttavat omalta osaltaan pintatiheyteen, koska emäkset ovat vaihtelevissa määrin vuorovaikutuksessa hiukkasen, esimerkiksi kullan, pinnan kanssa riippuen käytetystä emäksestä.⁷³ Välikealueella, usein noin 10 nukleotidia/3 nm, voidaan pinnan aktiivinen oligonukleotidisekvenssi saada kauemmas esimerkiksi positiivisesti varautuneesta AuNP-ytimeistä. Tämä antaa joustavuutta sitoutumisessa, joka vähentää steerisiä esteitä. Esimerkiksi T₁₀ välikekappaleen käyttö 15 nm AuNP-ytimellä mahdollistaa suuremman maksimitiheyden 38 pmol/cm², kun taas adeniinilla se on 19 pmol/cm². PEG välikappaleen käytöllä maksimitiheys on 56 pmol/cm², koska se ja Au-hiukkaset ovat vähäisesti vuorovaikutuksessa keskenään.³⁴

Ytimen lähellä olevien DNA-emästen valinnan lisäksi suuremman DNA-pintatiheyden saamista edistää suuri kaarevuuskulma. Kulma luo vapaamman tilan yksittäiselle juosteelle,

jolloin on vähemmän steerisiä esteitä ja elektronisia hylkimisrajoituksia. Myös suolapitoisuutta nostamalla, korkeammalla lämmöllä sekä ultraäänikäsittelyllä voidaan lisätä oligonukleotidien tiheyttä pinnalla.

1.2 PAMAM-dendrimeerit

Polyamidoamiini- eli PAMAM-dendrimeerit ovat hyvin haaroittuneita synteettisiä makromolekyylejä, joiden rakenteet sekä koostumukset ovat hyvin määritellyt. PAMAM-dendrimeerit ovat peräkkäisistä synteeseistä muodostuneita rakenteita. Sukupolven 1, eli G0 (5), PAMAM-dendrimeeristä voidaan syntetisoida seuraavien sukupolvien rakenteita, G1 (6), G2 (7), G3, jne.⁶ (Kuva 3). Suurten sukupolvien rakenteet muistuttavat puuta, kun niitä tarkastellaan 2-ulotteisesti.⁷⁴ Dendrimeeri-sana koostuu kahdesta Kreikan kielen sanasta: *dendron*, joka tarkoittaa puuta, sekä *meros*, joka tarkoittaa osaa.⁷⁵ PAMAM-dendrimeereilla on paljon hyödyllisiä ominaisuuksia, joiden ansiosta ne ovat sopivia lääkeainekantajiksi soluihin ja geenien sekä geneettisen materiaalin⁷⁶ kuljetusten sovelluksiin.^{74,77} Lisäksi hyödyllisiä ominaisuuksia ovat niiden nanometriluokan pieni koko, 2 – 10 nm^{74,78}, pieni molekyylipaino,⁷⁹ biohyteensopivuus, vähäinen immunogeenisyys⁷⁶ sekä biohajoavuus⁸⁰. PAMAM-dendrimeerit voivat vapauttaa lääkeaineen hallitusti⁶ sekä omaavat hyvin vähäisen epäspesifisen proteiini sitoutumisen veressä.⁸⁰

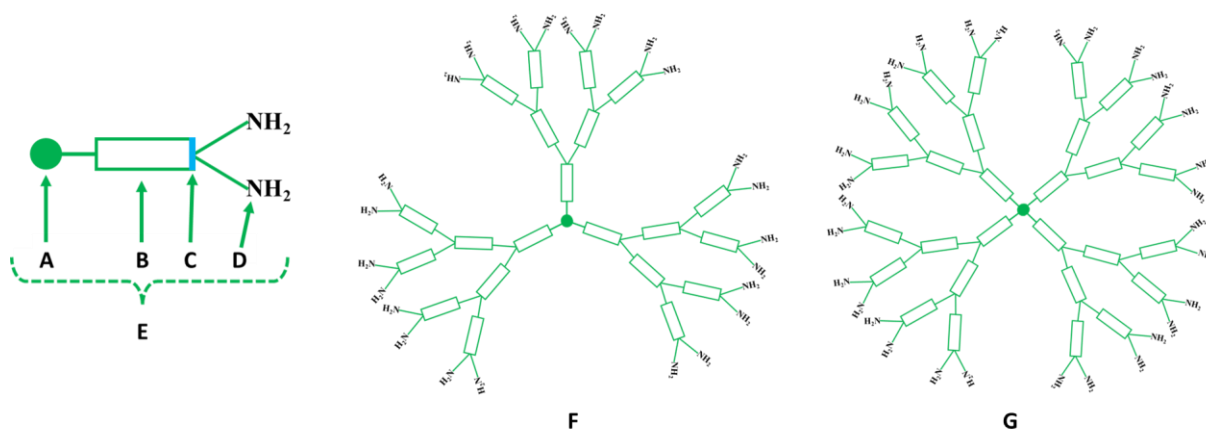


Kuva 3. Sukupolvien G0 (5), G1 (6) ja G2 (7) PAMAM-dendrimeerien rakenteet, synteessin aloitusmolekyylillä EDA.

1.2.1 Rakenne ja ominaisuudet

Ensimmäiset PAMAM-dendrimeerit syntetisoitiin vuonna 1985 Tomalia *et al.* tutkimusryhmässä, jolloin PAMAM-dendrimeerit nimettiin tähtisade polymeereiksi (*eng. Starburst polymers*).⁸¹ Nykyään ”Starburst dendrimersTM” ovat kaupallinen PAMAM-dendrimeerien alaluokka, jossa synteessin keskuksena on tris-aminoetyyleeni-imiini. Valittu PAMAM:in keskusmolekyylillä vaikuttaa sen pinnan varaustiheyteen.⁷⁴

PAMAM-dendrimeeri rakenne koostuu kolmesta komponentista, joita ovat ydin, eli aloittava molekyyli, sukupolvien toistuvat haaroittuvat yksiköt sekä toiminnalliset ryhmät ulkokuorella. PAMAM:en aloittava molekyyli, joka määrittää miten seuraavat sukupolvet jakautuvat, voi olla esimerkiksi ammoniakki tai etyleenidiamiini (EDA). Ammoniakissa on kolme ja EDA:ssa neljä kiinnityskohtaa amidoamiineille. Primaariset amiiniryhmät (-NH₂) ovat rakenteen pinnalla ja yhteen voi kiinnittyä aina kaksi haaraa lisää.⁸² (Kuva 4) Tertiääriset amiiniryhmät taas sijaitsevat rakenteen sisällä haarautumiskohdissa.⁸³



Kuva 4. PAMAM-dendrimeerin yleinen rakenne: A) ydin, B) toistuva yksikkö, C) amiiniryhmä, josta lähtee haaroitus, D) toiminnallinen ryhmä, E) yleinen rakenneseosa, F) dendrimeerirakenne, ytimenä ammoniakki, G) dendrimeerirakenne, ytimenä EDA. Mukailtu lähteestä ⁸².

Sukupolvien määrä vaikuttaa dendrimeerin rakenteen muotoon, G1 – G4 sukupolvien rakenteet ovat elliptisiä ja taas G5 – G10 sukupolvien rakenteet ovat pallomaisia, sillä tiheään pakatut haarat pakottavat dendrimeerin rakenteen pallomaiseksi. Sukupolvien määrä vaikuttaa myös molekyyliin painoon, kokoon sekä pintaryhmien funktionaalisten ryhmien lukumäärään, kuten taulukosta 1 ilmenee. Sukupolven G7 ja sitä suurempien sukupolvien rakenteissa on steerinen este, joka johtuu ahtaasta haaroitusrakenteesta, tätä kutsutaan *De Gennes dense packing effect*-ilmiöksi. Ilmiön vuoksi suurien sukupolvien (7 tai yli) haarautumisrakenteita syntetisoidaan myös vajaina ja näin ollen saanto vähenee.⁸⁴ Tästä syystä suurten sukupolvien PAMAM-dendrimeeri rakenteiden synteeseissä on haasteita.⁸⁵ PAMAM-dendrimeerien pienten ja suurten

sukupolvien rakenteilla on keskenään eroavaisuuksia. Pienempien sukupolvien rakenteilla on suurempi poolisuus ja ne vuorovaikuttavat proteiinien kanssa. Lisäksi sukupolven koon kasvaessa kasvaa sen toksisuus *in vitro*.⁷⁴

Taulukko 1. Sukupolvien 0 – 7 PAMAM-dendrimeerien molekyylipainot (ytimenä kystamiini) ja niiden hydrodynaamiset halkaisijat. Lisäksi ydinrakenteiden, etyleenidiamiini, kystamiini sekä ammoniakki, dendrimeerien NH₂-ryhmien lukumäärä rakenteiden ulkokuorella. Mukailtu lähteestä⁸⁴.

Sukupolvi	NH ₂ -ryhmien lkm. kuorella (kystamiini ja etyleenidiamiini)	Molekyylipaino (kystamiini) (g/mol)	Hydrodynaaminen halkaisija (nm)	NH ₂ -ryhmien lkm. kuorella (ammoniakki)
0	4	609	1,5	3
1	8	1 522	2,2	6
2	16	3 348	2,9	12
3	32	7 001	3,6	24
4	64	14 307	4,5	48
5	128	28 918	5,4	96
6	256	58 140	6,7	192
7	512	116 585	8,1	384

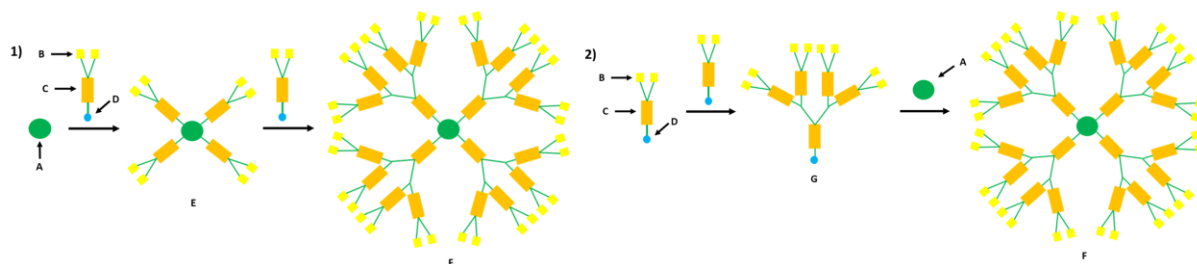
Dendrimeerien primääriset ja tertiääriset amiiniryhmät ovat dendrimeerin toiminnan kannalta oleellisia. Primääriset amiiniryhmät sijaitsevat PAMAM-dendrimeerin kuorella ja ne voivat sitoutua DNA:n kanssa.⁸⁶ Lisäksi ne edistävät DNA:n soluunottoa.⁷⁴ Tertiääriset amiiniryhmät sijaitsevat PAMAM dendrimeerin sisäosissa ja ne toimivat ns. ”protonisieninä”, sillä ne vastaanottavat protoneja protoninluovuttajilta.⁸⁶ Tertiääriset ryhmät vaikuttavat endosomeissa, jotka vapauttavat DNA:ta solulimaan.⁷⁴

Sukupolven 5 ja suuremmilla PAMAM-dendrimeeri rakenteilla muodostuu sisäalueille tyhjiä hydrofobisia tiloja, joihin voidaan kapseloida erilaisia yhdisteitä tai niitä voidaan hyödyntää lääkeaineenkuljetukseen. Tätä ilmiötä kutsutaan ”dendrimeeri laatikoksi”⁸⁷ tai ”yksimolekulaariseksi koteloinniksi”⁸⁸. PAMAM-dendrimeerien korkea liukoisuus, rakenne ja kemiallisesti monipuolisten pintaryhmien suuri määrä ovat niiden etuja, joiden ansiosta ne voivat toimia terapeuttisten aineiden kuljettimina.⁸⁹

PAMAM-dendrimeerien pinnan kemialla voidaan muokata, jotta pinnan NH₂-ryhmien ja positiivisen varauksen aiheuttamaa toksisuutta voidaan vähentää. Näin niistä saadaan bioyhteesopivampia⁹⁰ ja turvallisempia lääkeyhdisteiden kuljettimia. Yksi vaihtoehto on neutralisoida positiivista varausta esimerkiksi PEGylaatiolla⁹¹, asetylaatiolla⁹² tai peptidien konjugoinnilla⁹³. Pinnan negatiivista varausta voidaan lisätä esimerkiksi kiinnittämällä pintaan puolikkaiden sukupolvien dendrimeerirakenteita.⁹¹ Toksisuuden vähentämisen lisäksi muokkauksilla voidaan myös saada aikaan parempaa lääkeaineen kapselointia, liukoisuutta, modifioitua lääkeaineen vapautumista, kohdentamista ja pysyvyyttä.⁹⁴

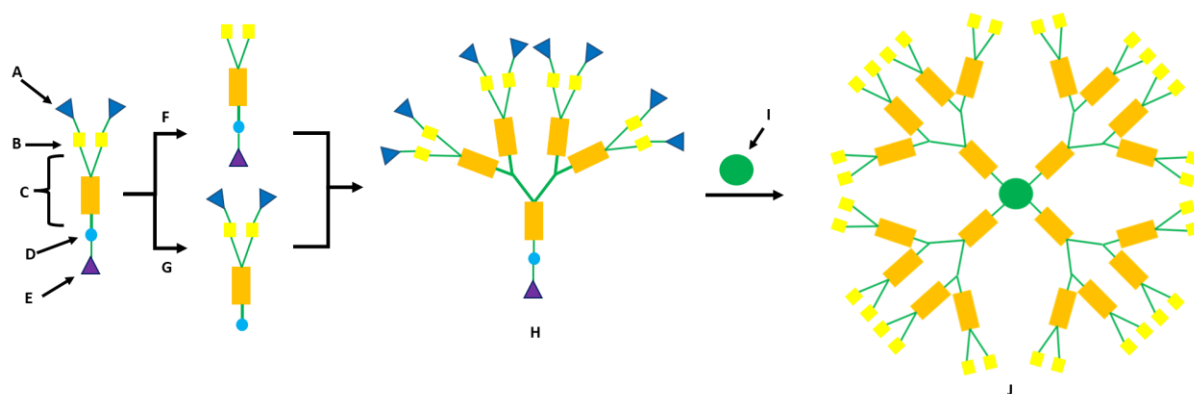
1.2.2 Synteesireitit

Dendrimeerien synteesireittejä on neljä erilaista, joita ovat erisuuntiin hajautuva synteesi (*eng. divergent synthesis*)⁹⁵, yhdistyvä synteesi (*eng. convertegent synthesis*)⁹⁶, hybridi synteesireitti⁹⁷ sekä klik-synteesi. Tomalia *et al.* julkaisivat erisuuntiin hajautuvan synteesimentelmän, joka on kaksivaiheinen synteesimentelmä. Synteesimentelmässä on heikkouksia, sillä sen sivutuotteet ovat rakenteellisesti samankaltaisia lopputuotteen kanssa, jolloin puhdistus on hankalaa. Lisäksi siinä tapahtuu epätoivottuja sivukasvutapahtumia. Synteesi alkaa esimerkiksi EDA-molekyylillä, johon liitetään Michaelin additiolla metyyliakrylaatti ja sen jälkeen välituote amidoidaan EDA:lla. Tätä kahden-vaiheen synteesimentelmää toistamalla voidaan kasvattaa PAMAM-dendrimeerin kokoa sukupolvesta seuraavaan.^{81,88,95} Yhdistyvän synteesimentelmän kehittivät Hawker ja Frechet.⁹⁶ Yhdistyvän synteesin tuotteet on helpompi puhdistaa kuin hajautuvan synteesin, sillä haarakkeet (*eng. dendron*) ovat huomattavasti erilaisempia sivutuotteiden kanssa, jolloin puhdistukseen riittää lievät reaktio-olosuhteet. Lisäksi siinä tapahtuu vähemmän epätoivottuja kasvutapahtumia, eli osa haarakkeista jää vajaiksi tai kasvavat liikaa, jolloin lopputuotteena saadaan parempi monodispersio seos kuin hajautuvalla synteesillä. Synteesissä haarautuneen monomeerin aktivoitu yksikkö kiinnitetään toisen monomeerin funktionaalisen ryhmän kanssa. Nämä muodostavat yhdessä dendrimeerin haarakkeen. Haarakkeen kokoa voidaan kasvattaa liittämällä monomeerejä toistuvasti päähaarakkeeseen, kunnes saavutetaan haluttu dendrimeerin koko. Haarakkeen aktivoituun yksikköön kiinnitetään ydin, jolloin tuotteena saadaan valmis PAMAM-dendrimeeri.^{96,98} (Kaavio 1.)



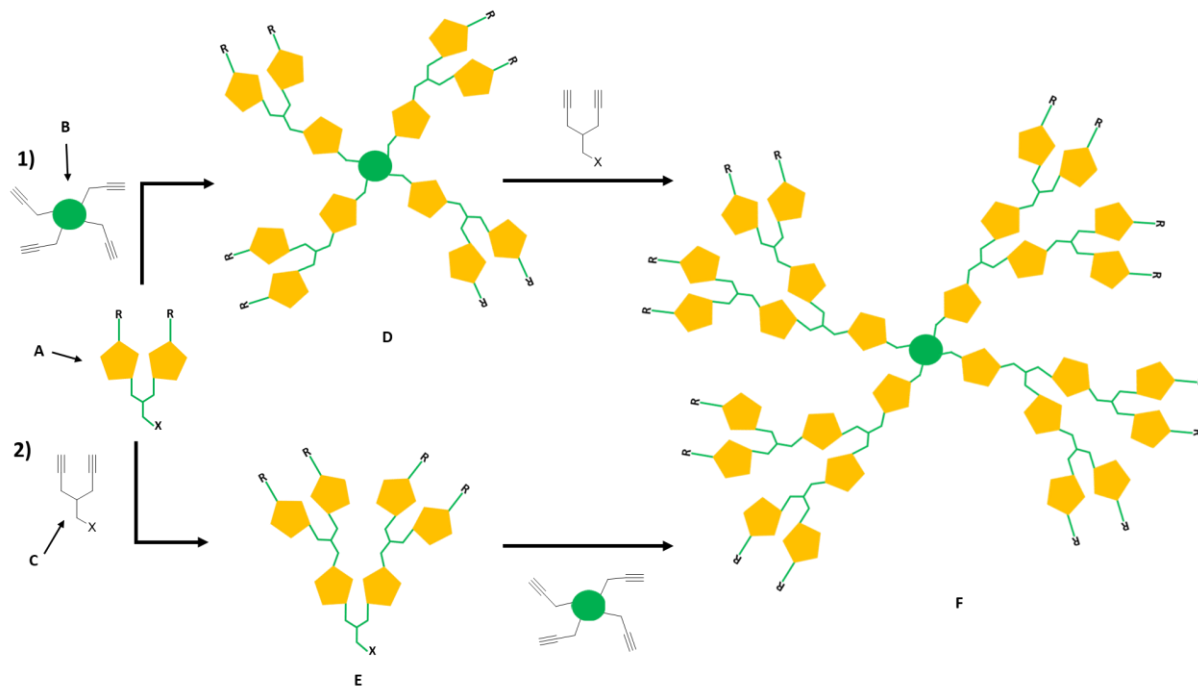
Kaavio 1. 1) Erisuuntiin hajautuva synteesi: Ydin (A, aloittava molekyyli, esimerkiksi EDA) reagoi haarautuneen monomeerin (C, esimerkiksi metyyliakrylaatti) aktivoitun yksikön (D) kanssa, jolloin välituotteena saadaan puolikkaan sukupolven rakenne (E). Välituote reagoi ytimen kanssa, jolloin tuotteena saadaan ensimmäisen sukupolven dendrimeeri (F). Korkeamman asteen dendrimeerit syntetisoidaan toistamalla sama kaksivaiheinen-synteesi. (B) kuorella oleva funktionaalinen ryhmä, -NH₂. 2) Yhdistyvä synteesi: Haarautuneen monomeerin (C) aktivoitu yksikkö (D) kiinnitetään toisen monomeerin funktionaalisen ryhmän kanssa (B), jolloin saadaan dendrimeerin haarake (G). Jos haarakkeen kokoa kasvatetaan toistetaan edellinen synteesisvaihe tai haarakkeeseen liitetään ydin (A), jolloin tuotteena saadaan dendrimeeri (F). Mukailtu lähteestä ⁹⁸.

Kawaguchi *et al.* julkaisivat hybridimenetelmän ”kaksinkertainen eksponentiaalinen kasvu” (*eng. double exponential growth*), joka yhdistää hajautuvan ja yhdistyvän synteesismenetelmät. Valmiin dendrimeerin sukupolvi kasvaa jokaisen aktivointi- ja kytkentäsynteesisvaiheen jälkeen, jonka seurauksena dendrimeerin koko kaksinkertaistuu. Dendrimeerin kasvattaminen on nopeaa, mutta tämä johtaa myös steeriseen esteeseen, jonka seurauksena syntyy epätäydellisiä reaktioita ja korkean sukupolven synteetit eivät onnistu.⁹⁷ Aluksi haarottuneiden monomeerien pintaryhmien suojaus poistetaan eri synteesisreiteillä, poistamalla funktionaalisten ryhmien suojaryhmät tai aktivoitun pään suojaryhmät. Sitten monomeerit kytketään yhteen ja välituotteena saadaan kaksoissuojattu ensimmäisen sukupolven dendrimeerin haarake (H). Dendrimeerin haarakkeesta voidaan syntetisoida suuremman sukupolven haarake, poistamalla suojaryhmät (sininen) ja toistuvalla monomeerin kytkennällä. Vaihtoehtoisesti haarake välituote (H) voidaan kiinnittää aloitusmolekyyliin (esimerkiksi EDA), jonka jälkeen suojaryhmät poistetaan ja tuotteena saadaan valmis PAMAM-dendrimeeri.⁹⁸ (Kaavio 2.)



Kaavio 2. 3) Hybridi synteesimenetelmä: Haaroittunut monomeeri (C) on suojattu suojaryhmillä A ja E. Poistetaan suojaryhmät A ja E (F tai G synteesireitti) monomeereistä, jotka liitetään yhteen, jolloin saadaan kaksoissuojattu haarake välituote (H). Välituotteen kokoa voidaan kasvattaa poistamalla suojaryhmä E ja liittämällä aktivoitu monomeeri. Tai voidaan syntetisoida PAMAM-dendrimeeri (J), kytkemällä ytimeen (I) ja poistamalla A-suojaryhmät. B) kuorella oleva funktionaalinen ryhmä, $-NH_2$, D) aktivoitu yksikkö. Mukailtu lähteestä ⁹⁸.

Myös alkyynin ja atsidin Cu(I)-katalyyttistä sykloadditioreaktiota 1,2,3-triatsoliksi ("napsautus"-kemialla), on hyödynnetty PAMAM-dendrimeerien synteesiin. Kytkeäntäspesifisyys, lievät reaktio-olosuhteet sekä kvantitatiivinen saanto ovat synteesimenetelmän etuja.⁹⁹ Lisäksi menetelmän etuna on sen monipuolisuus. Sillä voidaan valmistaa sekä symmetrisiä¹⁰⁰ että epäsymmetrisiä (eri sukupolvien haarakkeet yhdistetään)¹⁰¹ PAMAM-dendrimeerejä. Synteesissä valmistetaan aluksi haarautunut alkyynimonomeeri, jossa on alkyylidikloridi aktivoituna yksikössä sekä funktionaaliset ryhmät, jonka jälkeen menetelmässä on kaksi reittiä: hajautuva (1) ja yhdistyvä (2), joilla syntetisoidaan triatsoli-PAMAM-dendrimeeri. Hajautuvassa reitissä monomeerin alkyylidikloridi muutetaan atsidiksi, johon kiinnitetään trialkyyniydin, jolloin saadaan välituotteena dendrimeeri. Tämän dendrimeerin kokoa voidaan kasvattaa funktionaalisten ryhmien toistuvalla reaktiolla (*eng. iterative synthesis*) haarautuneeseen alkyyniin, jota seuraa atsidiosan napsautus-kytkentä, jolloin tuotteena saadaan valmis triatsoli-dendrimeeri.⁹⁸ Yhdistyvässä reitissä saadaan välituotteena dendrimeerin haarake, kun kiinnitetään haarautunut alkyyni monomeerin funktionaalisiin ryhmiin, jonka jälkeen alkyyni reagoi atsidin kanssa. Haarakkeen kokoa voidaan kasvattaa toistamalla tämä kaksiosainen vaihe, jolloin saadaan korkeamman asteen dendrimeerin haarakkeita. Valmis dendrimeeri saadaan, kun haarakkeen alkyylidikloridi muunnetaan atsidiksi ja liitetään trialkyyniytimeen.^{98,102,103} (Kaavio 3)



Kaavio 3. 1) Hajautuva synteysi reitti: monomeerin (A) aktivoituun yksikkö (X) muutetaan atsidiksi, johon liitetään trialkyyniydin (B), saadaan välituotteena dendrimeeri (D). Sitä seuraa funktionaalisten ryhmien (R) toistuva reaktio sarja haarautuneeseen alkyyniin (C) ja atsidiosan napsautus-kytkentä, jolloin tuotteena dendrimeeri (F). 2) Yhdistyvä synteesisireitti: A:n funktionaalisiiin ryhmiin (R) kiinnitetään haarautunut alkyyni (C), ja se reagoi atsidin kanssa, jolloin tuotteena haarakke E. E:n kokoa voidaan kasvattaa, toistamalla edelliset vaiheet. Tai aktivoitu yksikkö X voidaan muuttaa atsidiksi ja kiinnittää trialkyyniytimeen (B), jolloin tuotteena saadaan valmis dendrimeeri (F). Mukailtu lähteestä ⁹⁸.

1.2.3 Sovellutukset

PAMAM-dendrimeereilla on etuja, kun niitä hyödynnetään kohdennetun lääkeaineenkuljettimina. PAMAM:it voivat suojata normaaleja soluja niille myrkyllisiltä aineilta, vähentää lääkeannoksen aiheuttamia sivuvaikutuksia sekä välttää syöpäsolujen lääkeresistenssin.¹⁰⁴ Lisäksi niiden etuja ovat kolmiulotteinen rakenne, pinnan funktionaalisten ryhmien määrä, hyvä vesiliukoisuus ja se, että ne ovat monodispersioiseoksena.⁷⁴ Lääkemolekyylit voidaan kuljettaa PAMAM:illa kahdella tavalla, joko kapseloimalla ne dendriittirakenteen sisäosien onkaloihin tai niin, että lääkeaine on vuorovaikutuksessa sähköstaattisin tai kovalenttisin sidoksin pinnan funktionaalisten ryhmien kanssa.¹⁰⁵ Esimerkiksi Behrooz et al. konjugoivat AS1411-aptameerin, joka valittiin MKN45 mahasyöpäsolujen kohdistamiseen, PAMAM-PEG:iin. ATP-PAMAM-PEG-ryhmä ladattiin fluorourasiililla (F-5U) ja järjestelmän käyttö paransi F-5U:n soluunottoa.¹⁰⁶

PAMAM-dendrimeeri on tutkimusten perusteella tehostanut lääkeaineen kuljettamista myös muunlaisiin syöpäsoluihin, kuten rintasyöpäsoluihin^{107,108}, jotka ilmentävät HER2:ta. HER2

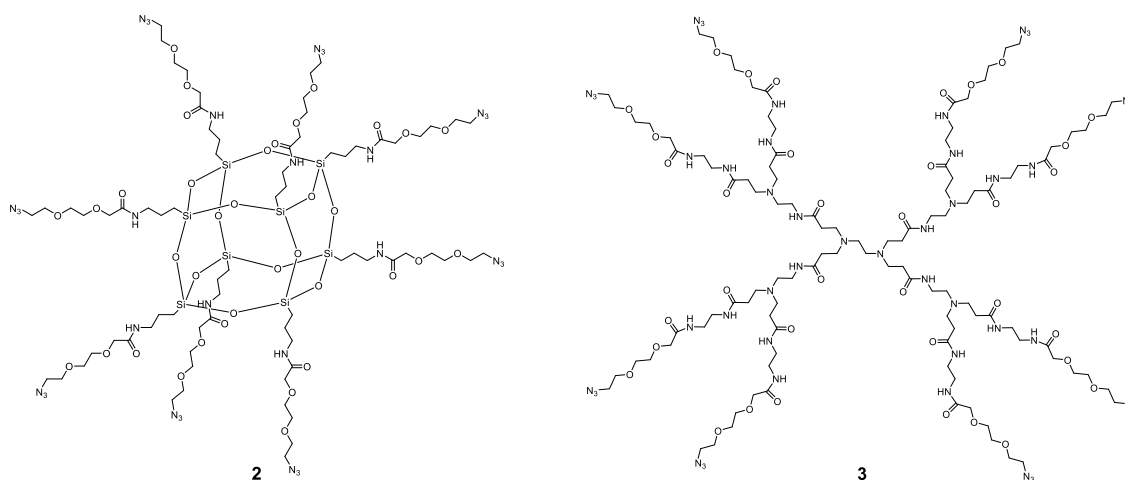
(tai ERBB2) on ihmisen epidermaalinen kasvutekijä reseptori 2, joka edistää joidenkin syöpäsolujen kasvua.^{109,110} HER2-positiivinen rintasyöpä leviää nopeammin ja on aggressiivisempi kuin HER2-negatiivinen (noin 20 % rintasyövistä on HER2-positiivisia)¹¹¹. Lisäksi HER2 rintasyöpää on vaikeampia hoitaa hormonihoidoilla.¹¹² Kulhari *et al.* syntetisoivat sukupolven 4 PAMAM-dendrimeeriin trastutsumabia (Tz), käyttämällä MAL-PEG-NHS (Maleimidi-poly(etyleeni)glykoli-*N*-hydroksibutaani-imidi) käsivarsirakennetta. Rakenteen toivottiin tehostavan dosetakselin kuljettamista HER2-positiiviseen rintasyöpään.¹¹³ Trastutsumabi on monoklomaalinen vasta-aine, joka tunnistaa HER2:ta.¹¹⁴ Dosetakseli on puolisynteettinen paklitakselin vastine, jota käytetään syöpien hoidossa. Huolimatta dosetakselin aktiivisesta käytöstä, sillä on haittoja, kuten huono vesiliukoisuus, epäspesifinen toksisuus sekä huono biologinen hyötysuhde.¹¹⁵ Tutkimuksen perusteella apoptoottisten solujen osuus kokonaisprosentista oli pelkällä dosetakselilla 16,5 %, kun taas dosetakseli-PAMAM:illa 32,7 % ja dosetakseli-PAMAM-Tz:lla 42,6 %. PAMAM ja Tz paransivat dotakselin kuljetusta kohdesoluihin huomattavasti.¹¹³

PAMAM-dendrimeerien potentiaalia geenikuljettimina on tutkittu, sillä ne kykenevät muodostamaan pysyviä PAMAM-nukleiinihappo komplekseja¹¹⁶, jotka estävät nukleaasin toimintaa. Geenihoidossa nukleiinihappojen kuljetuksessa kohdesoluihin ja -kudoksiin tarvitaan erikoisominaisuuksia kuljettimelta, sillä nukleiinihappojen sokerirunkoa yhdistävistä fosfaattiryhmistä johtuva negatiivinen varaus estää soluunottoa.⁶ PAMAM-dendrimeerin ja DNA:n muodostava kompleksi pystyy sitoutumaan negatiivisiin solukalvon pintamolekyyleihin ja pääsee solun sisälle epäspesifisen endosytoosin kautta. Lysosomit hajottavat kompleksin ja vapauttavat kohdeoligonukleotidin.¹⁰⁴

1.3 Työn tarkoitus

Työssä tarkastellaan molekulaaristen PAMAM G1 (3)- ja POSS (2)-ydinrakenteiden soveltuvuutta molekulaarisiin SNA-synteeseihin. Lisäksi SNA-synteesin sopivia olosuhteita pyritään optimoimaan, kontrolloimalla suolapitoisuutta oligonukleotidien liittämiseen käytetyn rengasjännityksen ajaman alkyyni-atsidi-sykloaddition (SPAAC) aikana. Työn tavoitteena on syntetisoida valmiit SNA-rakenteet, joita voidaan käyttää solukokeissa. Lopullisena tavoitteena on tutkia eri ydinrakenteiden merkitystä SNA:n käyttäytymisessä soluunotossa *in vitro* sekä biodistributiossa *in vivo*. PAMAM ja POSS ovat bioyhteensopivia ydinrakenteita. Ydinrakenteen bioyhteensopivuus ja biohajoavuus ovat etuna verrattuna ytymiin, jotka jäävät solun sisään ja aiheuttavat toksisuutta. Tästä syystä työssä on valittu pallonukleiinihappojen

ydirakenteiksi sukupolven 1 PAMAM-dendrimeeri sekä POSS-häkkirakenne (Kuva 5). Työssä valittu 15-meerin oligonukleotidisekvenssi: 5'-CTC-CAT-GGT-GCT-CAC-3', on antisense-sekvenssi ihmisen epidermaalisen kasvutekijäreseptorin 2 (HER2 tai ERBB2) mRNA:ta vastaan.²³ Vastaavanlaista oligonukleotidisekvenssiä on käytetty SNA-synteeseissä aikaisemmin. Li *et al.* liittivät 18-meerisen antisense oligonukleotidin muokattuun POSS-häkkirakenteeseen.²³ Tässä työssä liitetään oligonukleotidien **ON2** 3'-päähän välikappale ja BCN-rakenne, kun taas Li *et al.* käyttivät eri käsivarsirakennetta (DBCO-TEG) ja muokkaukset tehtiin 5'-päähän²³.

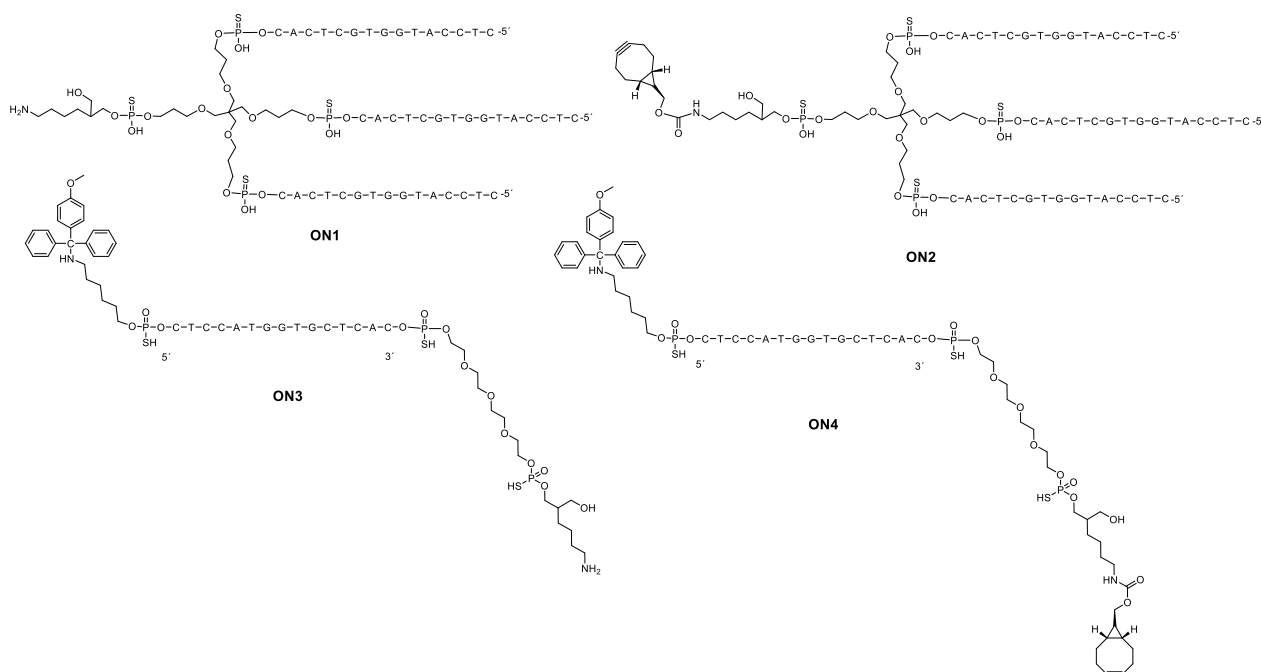


Kuva 5. Työssä SNA:n ytiminä käytetyt molekulaariset ydirakenteet: POSS (**2**) ja PAMAM G1 (**3**). Ydirakenteisiin; **2** ja **3**, kiinnitetään atsidi-modifioitu käsivarsirakenne, jolloin oligonukleotidit saadaan kiinnittymään SPAAC-ligaatiolla muokattuun ydirakenteeseen. Työssä valmistetaan aminomuokattuja 3-haaraisia oligonukleotideja, joihin tehdään bisyklononyyni (BCN)-modifikaatio. Lisäksi valmistetaan 3-haaraisen oligonukleotidin yhtä juostetta vastaava juoste 5'-CTC-CAT-GGT-GCT-CAC-3'. Haaroitusrakenteen ansiosta valmiin SNA:n oligonukleotidikuori on tiheä, sillä BCN-modifikaatioon saadaan kiinnitettyä haaroitusrakenteen ansiosta tiheämpi oligonukleotidikuori. POSS- ja PAMAM G1-ydirakenteilla BCN-modifikaatioita on 8, mutta haaroitusrakenteen ansiosta ydirakenteisiin saataisiin kiinnittymään 24 oligonukleotidijuostetta.

2 Tulokset ja niiden tarkastelu

Aminomuokatut oligonukleotidit **ON1** ja **ON3** syntetisoitiin kaupallisista rakenneyksiköistä automatisoidulla DNA-syntetisaattorilla, puhdistettiin ja muutettiin post-synteettisesti BCN-muokatuiksi oligonukleotideiksi **ON2**, ja **ON4**. **ON2** ja **ON4** kiinnitettiin atsidimuokattuihin ydinrakenteisiin SPAAC-reaktiolla.⁶³ SNA-reaktioita seuratiin HPLC:llä ja geelielektroforeesilla. Massaspektrometrisesti saatiin karakterisoitua osa syntetisoiduista rakenteista. Lisäksi tulosten tarkastelussa käsitellään SNA-synteesin olosuhteiden optimointia säätelämällä NaCl-pitoisuutta liuoksessa.

2.1 Fosforotioaattioligonukleotidit



Kuva 6. Valmistetut fosforotioaattioligonukleotidit **ON1**, **ON2**, **ON3** ja **ON4**.

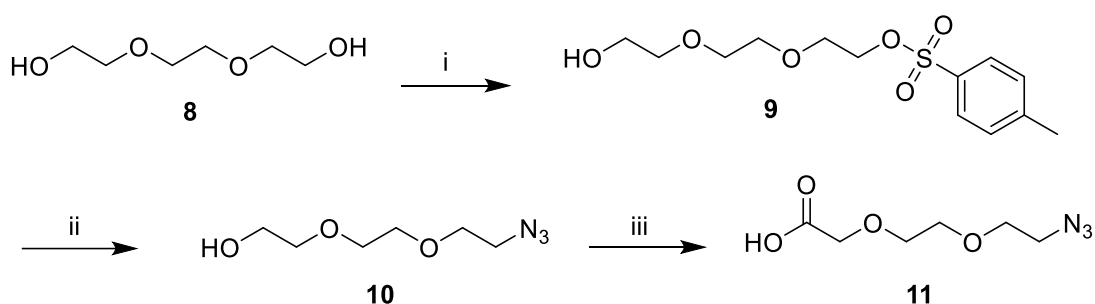
Oligonukleotidin **ON1** haaroitukseen käytettiin välikappaleena *long trebler* fosforamidiittia. Shchepinov *et al.* ovat käyttäneet samaa rakenneyksikköä 3-haaraisten 15-meeristen oligonukleotidien (eri sekvenssi) synteeseissä.¹¹⁷ BCN:n post-synteettiseen liittämiseen käytettiin karbamaattikytkentää. Oligonukleotidisynteesit onnistuivat hyvin ja ne saatiin puhdistettua RP-HPLC-kromatografisesti ja karakterisoitua massaspektrometrisesti.

ON3 välikappaleena käytettiin tetraetyleeniglykolia, joka valmistettiin osana projektia. Välikappale kiinnitettiin käytettyyn kantajaan manuaalisesti ja loput kytkennöistä tehtiin automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. **ON3**:n 5'-pään kiinnitetyn heksyyliamiinin suojaryhmänä oli MMT, jotta BCN saatiin kiinnitettyä selektiivisesti oligonukleotidin 3'-

päähän. Lisäksi 5'-päässä olevan *aminomodifierin* avulla voidaan myöhemmin leimata oligonukleotidi solukokeita varten.¹¹⁸ Tavoitteena oli monofunktionalisoida oligonukleotidi **ON4** muokattuun SNA-ytimeen, jolloin vain yksi juoste olisi leimattu.

Oligonukleotidin **ON3** saanto oli melko heikko, koska suurin osa tuoteseoksesta oli oligonukleotidia, josta puuttui 5'-MMT-suojaryhmä. Osittainen MMT:n irtoaminen tapahtui siitä huolimatta, että kylmäkuivauksessa käytettiin di-natriumvetyfosfaatin vesiliuosta (pH \approx 7,5), jotta liuosjäännös pysyisi emäksisenä.¹¹⁹ Haluttu tuote **ON3** saatiin eristettyä ja siihen liitettyä BCN-rakenteeseen, jolloin saatiin oligonukleotidia **ON4**. RP-HPLC-puhdistusten jälkeen oligonukleotidit karakterisoitiin massaspektrometrisesti.

2.2 Käsivarsirakenteen (11) synteesi



Kaavio 4. Käsivarsirakenteen synteesikaavio: trietyleeniglykolista (**8**) tuotteeksi (**11**). i) *p*-tolueenisulfonyylikloridi, TEA, DCM (Saanto 5 %). ii) NaN₃, DMF (Saanto 80 %). iii) CrO₃, H₂SO₄ (aq), asetoni.

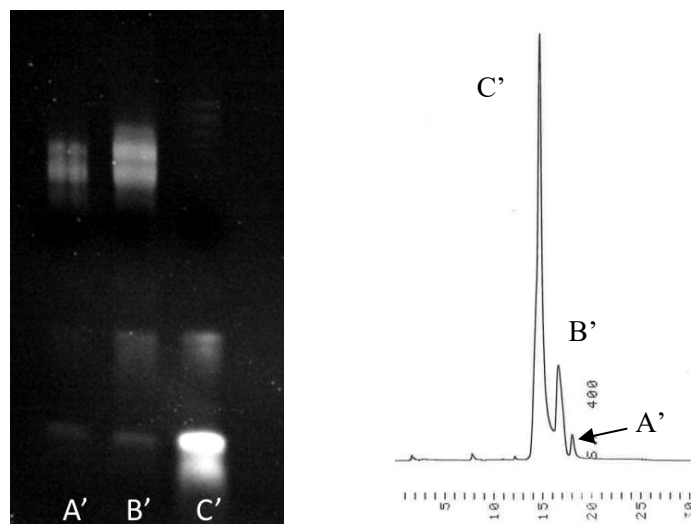
SNA-synteesien ydinrakenteeseen kiinnitettävä käsivarsirakenne **11** syntetisoitiin kolmivaiheisella synteesisarjalla. (Kaavio 4) Synteesissä sovellettiin jo julkaistua menetelmää.^{120–122} Ensimmäisissä kahdessa synteesivaiheessa saatiin eristettyä välituotteet **9** ja **10**. Tosyloidun välituotteen (**9**) saanto oli heikko (5 %), mutta tuotetta oli tarpeeksi seuraavaa synteesiä varten. Atsidoidun tuotteen (**10**) saanto oli hyvä (80 %) ja tuote saatiin puhdistettua. Tuotetta **11** ei saatu eristettyä tuoteseoksesta, joten PAMAM-ytimen synteesissä käytettiin kaupallista käsivarsirakennetta.

2.3 SNA-synteesit

SNA-synteesit olivat kaksivaiheinen synteesimenetelmä, jossa aluksi liitettiin yksi oligonukleotidi atsidimuokattuun ydinrakenteeseen SPAAC-reaktiolla DMSO-vesiliuoksessa.⁶³ Tämän jälkeen vapaisiin ytimen haarakkeisiin liitettiin loput oligonukleotidit. Reaktio tehtiin vesiliuoksessa ja tietyillä NaCl-konsentraatioilla. Tuotteet HPLC-puhdistettiin sekä karakterisoitiin massaspektrometrisesti ja geelielektroforeesilla.

2.3.1 Synteisien suolapitoisuudet

Tässä työssä pyrittiin optimoimaan SNA-synteisien olosuhteita koska ensimmäisessä synteesissä ei saatu valmista POSS-SNA-rakennetta (**2**) (kuva 7). SNA-synteesissä on käytetty aikaisemmissa tutkimuksissa eri NaCl-pitoisuuksia. Esimerkiksi Li *et al.* syntetisoivat onnistuneesti POSS-SNA:ta yksijuosteisilla HER2 antisense oligonukleotideilla, 1,5 M NaCl-vesiliuoksessa.²³ Gulumkar *et al.* käyttivät C₆₀-fullereenin SNA-synteesissä myös 1,5 M NaCl-vesiliuosta.⁶³ Hurst *et al.* määrittivät, että pallonukleinihapon (AuNP-ydin ja polyetyleeniglykoli-välikappale) DNA:n maksimilukumäärä kuorella saavutetaan noin 0,7 M NaCl-konsentraatiolla.³⁴ Hill *et al.* tutkivat 20 nm halkaisijan AuNP-hiukkasen oligonukleotidien maksimilatausmäärää kuorella 0,1 – 2 M NaCl-pitoisuuksilla. Heidän tulosten perusteella 1 M NaCl-pitoisuudella saavutettiin maksimilatausmäärä.⁶⁷ Tässä työssä ensimmäinen SNA-synteesi tehtiin NaCl-pitoisuudella 0,75 M, mutta osa liuoksesta sakkasi reaktioliuoksen pohjalle. NaCl-pitoisuuden muutoksen toivottiin parantavan liukoisuutta ja keskusrakenteen funktionalisointia oligonukleotideilla.



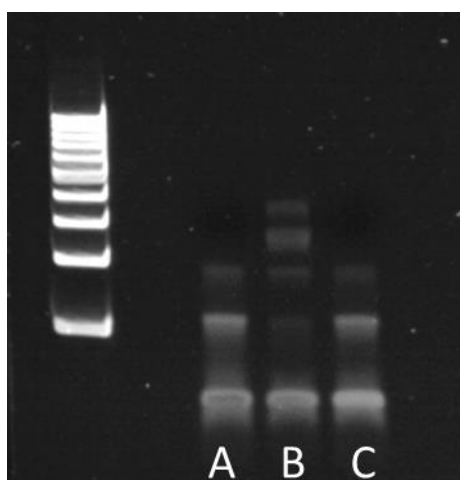
Kuva 7. SNA-täysfunktionalisointisynteisin ($c(\text{NaCl}) = 0,75 \text{ M}$) geielektroferogrammi sekä HPLC-puhdistuksen kromatogrammi. A', B' ja C' ovat tuoteseoksia, joissa on monofunktionalisointi tuotteen lisäksi suurempia funktionalisointiasteiden rakenteita.

NaCl-pitoisuudella voidaan säädellä oligonukleotidien ”latausmäärää”.^{23,34} Tästä syystä SNA-synteesissä käytettiin erilaisia NaCl-konsentraatioita ja reaktioiden etenemistä seurattiin HPLC:llä ja geielektroforeesilla. Taulukossa 2 on kvalitatiivinen analyysi reaktioista eri suolapitoisuuksilla ja eri ydinrakenteita käyttäen. Reaktioiden oletettiin olevan lopussa kolmessa päivässä huoneenlämmössä. Liian pienillä NaCl-pitoisuuksilla reaktio ei kuitenkaan edennyt kunnolla. Reaktiot 0,02 ja 0,1 M NaCl-pitoisuudessa eivät olleet edenneet kovin hyvin

geelielektroferogrammin perusteella (Kuva 8). Tämän jälkeen NaCl-pitoisuus nostettiin 0,5 M ja reaktiot HPLC-puhdistettiin 3 päivän jälkeen. Reaktiot olivat edenneet, mutta lopullista SNA-tuotetta ei saatu syntetisoitua ja eristettyä tuoteseoksesta. Näiden synteesien perusteella NaCl-konsentraation tulee olla vähintään 0,3 M. Lisätutkimukset ovat tarpeen, jotta voidaan määrittellä onnistuisiko SNA-synteesi 0,3 M NaCl-konsentraatiolla, jos reaktioissa käytetään yksijuosteista oligonukleotidia.

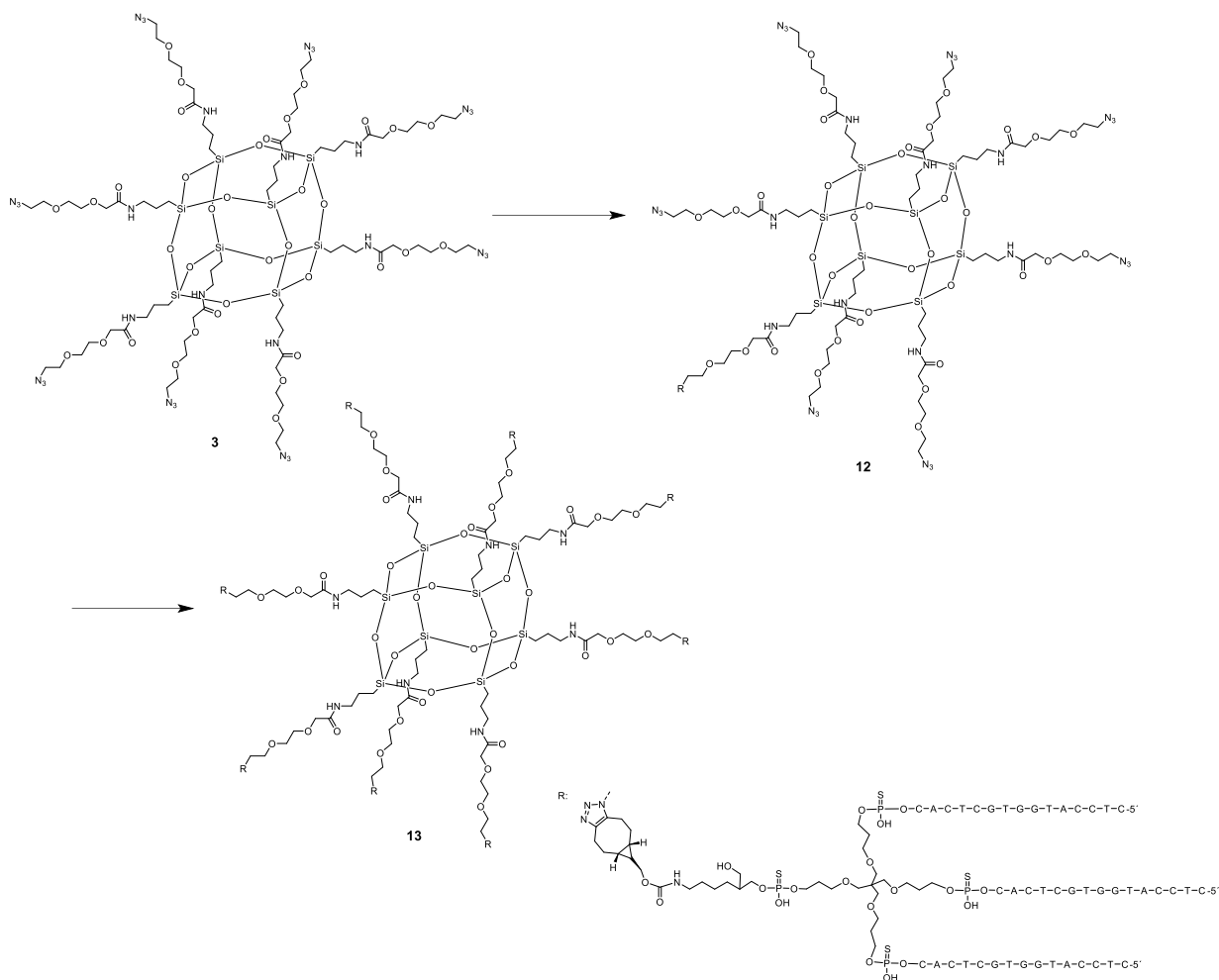
Taulukko 2. SNA-täysfunktionalisointisynteesien NaCl-suolapitoisuudet. Synteesissä käytetty ydin sekä NaCl-pitoisuus reaktiossa. Lisäksi esitetty, jos reaktio HPLC-puhdistettiin kolmen päivän jälkeen sekä mahdollinen tehty suolakonsentraation muutos. Synteesien etenemistä seurattiin raakatuotteiden geelielektroforeesilla.

Ydin	NaCl-konsentraatio (M)	HPLC-puhdistus	Uusi NaCl-konsentraatio (M)
POSS (2)	0,02	ei	0,5
POSS (2)	0,1	ei	0,5
POSS (2)	0,3	kyllä	-
POSS (2)	0,75	kyllä	-
G1 (3)	0,3	kyllä	-
G1 (3)	0,3	kyllä	-



Kuva 8. Geelielektroferogrammi kolmen päivän jälkeen, kolmelle raakatuoteseokselle. Eri NaCl-konsentraatiot: A: 0,1 M-liuos; B: 0,3 M -liuos; C: 0,02 M -liuos. Vasemmalla DNA referenssi 100 – 1000 bp.

2.3.2 POSS-ydinrakenteena



Kaavio 5. POSS-ydinrakenteen (**3**) SNA-synteesi: oligonukleotidilla **ON2** monofunktionalisoitu tuote (**12**) ja täysfunktionalisoitu tuote (**13**).

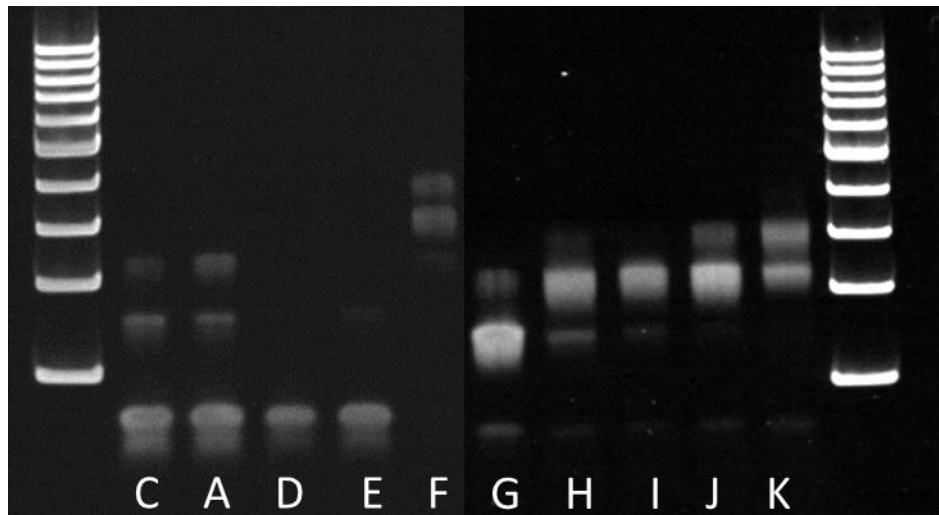
POSS-häkkirakennetta on aiemmin käytetty Li *et al.* tutkimisryhmän SNA-synteesien ydinrakenteena.⁸ Kyseisessä tutkimuksessa käytettiin myös samankaltaista HER2 oligonukleotidisekvenssiä kuin tässä työssä. Li *et al.* vertasivat C₆₀-fullereeni- ja POSS-SNA-rakenteiden eroja. Tutkimusten perusteella C₆₀-fullereeniytimelliset SNA:t otetaan soluun sisään noin kaksi kertaa tehokkaammin kuin POSS-SNA:t. Tämä oletettavasti johtui C₆₀-fullereenin tiheämmästä oligonukleotidikuoresta. POSS-ytimeen oli kiinnitetty 8 oligonukleotidijuostetta.²³ Tässä työssä POSS-rakenteeseen yritettiin kiinnittää 24 oligonukleotidijuostetta, jolloin oligonukleotidikuori olisi huomattavasti tiheämpi kuin tutkimuksen C₆₀-fullereenin²³. Jos modifioituun POSS-rakenteeseen monofunktionalisoitaisiin onnistuneesti **ON4** ja sen jälkeen loput **ON2** oligonukleotidit, ydinrakenteeseen olisi silti liitetty 22 oligonukleotidijuostetta. Tällöin hypoteesina on, että POSS-rakenteen soluunotto tehostuisi verrattuna ytimeen, jossa on kiinnitettynä 8 oligonukleotidijuostetta. Jatkotutkimuksen

kohteena on **ON4** oligonukleotidin hyödyntäminen ytimen ensimmäisen vaiheen monofunktionalisoinnissa.

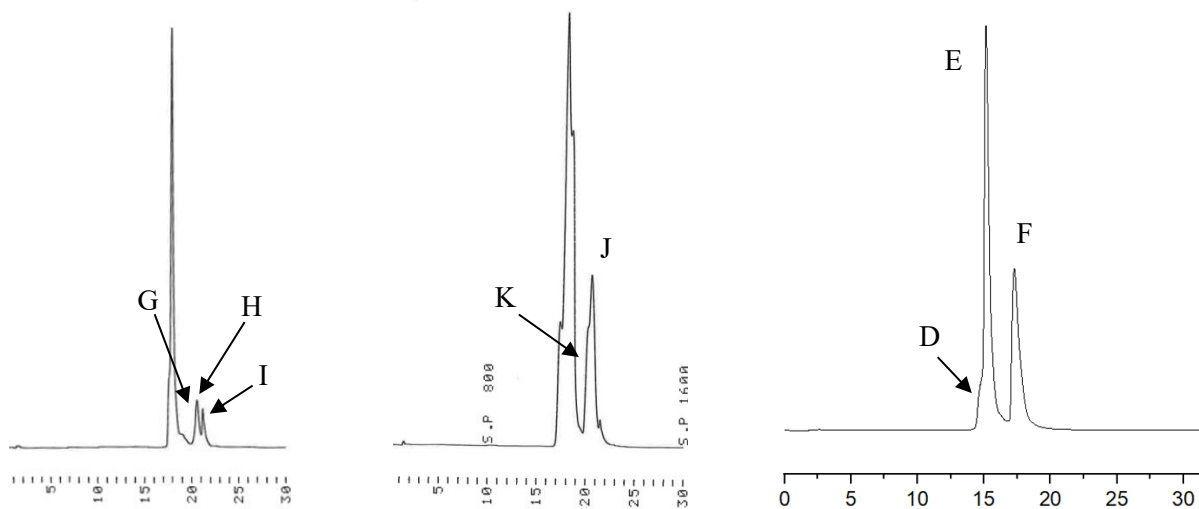
Työssä käytettiin POSS-ydinrakennetta (**2**), joka oli jo valmistettu tutkimusryhmän laboratoriossa. POSS-ydinrakenteen monofunktionalisointi onnistui 59 % saannolla ja tuote (**12**) saatiin karakterisoitua massaspektrometrisesti. Homogeenista lopputuotetta ei kuitenkaan saatu syntetisoitua, vaan tuloksena oli tuotteiden seos (Kaavio 5). Tuotetta **13** ei onnistuttu syntetisoimaan luultavasti oligonukleotidikuoren ahtauden vuoksi. Vapaita haarakkeita suojaavat jo kiinnittyneet oligonukleotidijuosteet.

Geelielektroforeesin perusteella ei voida karakterisoida SNA-rakenteita, mutta sillä voidaan arvioida niiden homogeenisuutta. Tavoitteena olisi, että HPLC-puhdistuksen fraktio olisi homogeeninen, jolloin SNA-tuoterakenne olisi onnistuttu erottamaan muista rakenteista. Lopullisen karakterisoinnin tulisi tapahtua massaspektrometrisesti tai SEC-MALS:illa (kokoerottelukromatografia, johon on yhdistetty monikulmavalonsirontadetektori).

Kuvan 8 B-raakatuote HPLC-puhdistettiin ja kerätyt fraktiot analysoitiin geelielektroforeesilla. Kuvassa 9 on B-raakatuotteen HPLC-puhdistuksessa kerätyt fraktiot, joista D on mahdollisesti mono- tai difunktionalisoitua tuotetta. E taas on kahden eri funktionalisointiasteen tuoteseos, mahdollisesti mono- ja difunktionalisoitujen rakenteiden seos tai di- ja trifunktionalisoitua tuoteseosta. F-fraktio sisältää suurempia funktionalisointiasteiden rakenteita, mahdollisesti 3-, 4- ja 5-funktionalisoituja rakenteita tai jopa suurempia. Kuvan 9 F-fraktion geelielektroferogrammi on hieman sumea, joten on vaikea määrittää onko yhdessä kohdassa useampia rakenteita. Koska F tuotefraktiota ei saatu karakterisoitua, ei voida olla varmoja, mikä on korkein funktionalisointiaste, joka saatiin aikaiseksi.



Kuva 9. Geelielektroferogrammi POSS-SNA-synteesin HPLC-puhdistusten fraktioille. C on raakatuote (aluksi $c(\text{NaCl}) = 20 \text{ mM}$). A on raakatuote (aluksi $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ M}$). D – F ovat ($c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ M}$) HPLC-puhdistuksen fraktiot. G – I ovat C-reaktion HPLC-puhdistuksesta kerättyjä fraktioita. J ja K ovat A-reaktion HPLC-puhdistuksesta kerättyjä fraktioita. Vasemmalla DNA referenssi 100 – 1000 bp.

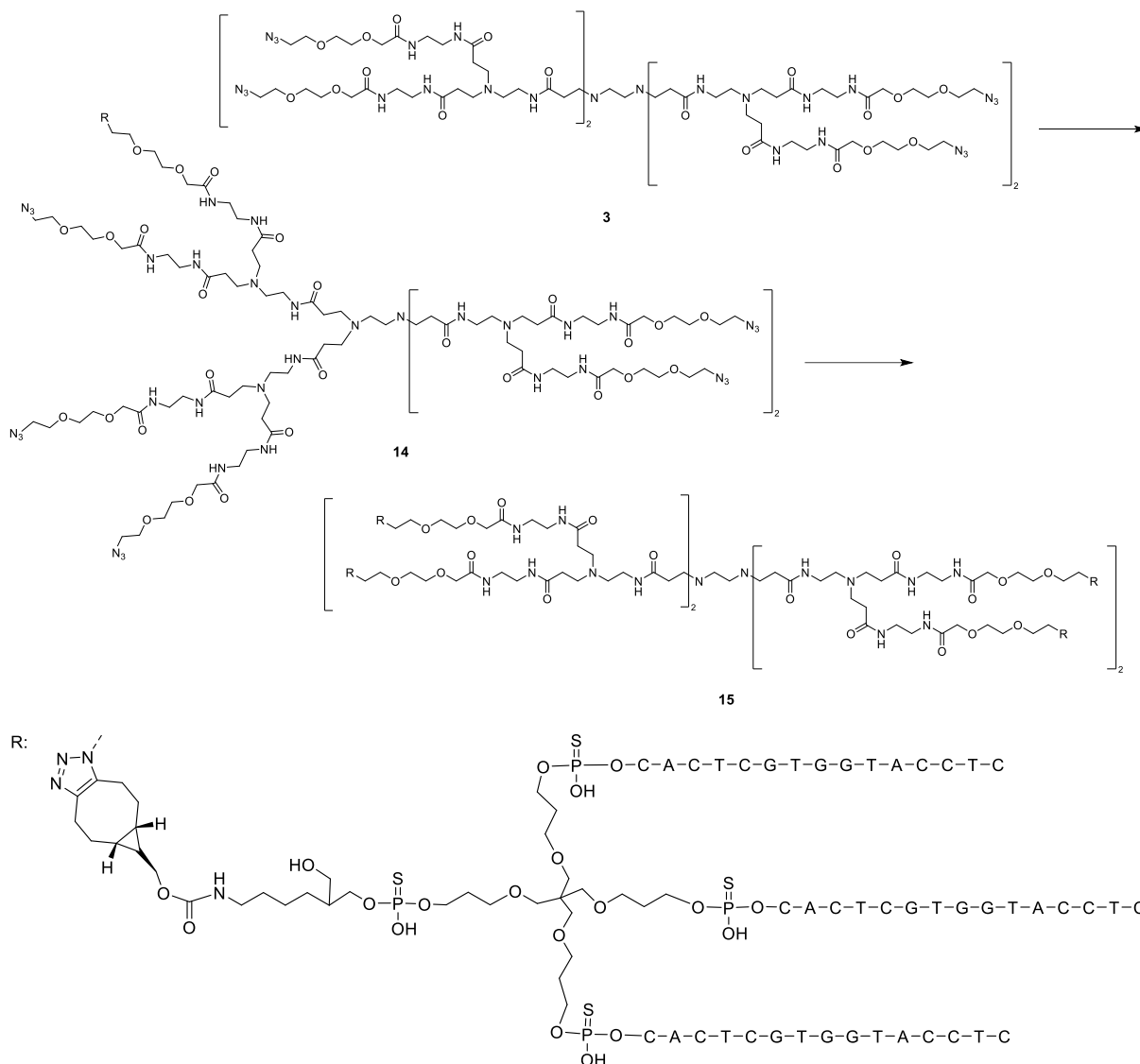


Kuva 10. HPLC-puhdistusten fraktiot, joihin merkattu mitkä kuvan 8 geelielektroferogrammin fraktiot ovat mitään. Vasemmalla $c(\text{NaCl}) = 20 \text{ mM}$ (C) reaktio, keskellä $c(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ M}$ (A) ja oikealla $c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ M}$ (B).

Edellä esitetystä kuvassa 8 ovat raakatuotteet, A ja C, ennen NaCl-pitoisuuden muutosta ja kuvassa 9 ovat raakatuotteet, A ja C, NaCl-lisäyksen jälkeen. Tuloksia vertailemalla huomataan, etteivät reaktiot olleet ehtineet edetä enempää yhdessä päivässä, joten niiden annettiin olla huoneenlämmössä vielä kolme päivää. Kuvan 8 geelielektroferogrammin G – K-fraktioita vertailemalla voidaan huomata, että C-raakatuotteen keskusrakenteen funktionalisointi oligonukleotideilla ei edennyt yhtä pitkälle kuin A-raakatuotteen. Huolimatta siitä, että molemmissa synteeseissä NaCl-konsentraatio nostettiin samaan (0,5 M) ja reaktioaika oli sama. Kaikki HPLC-fraktiot G – I sisältävät eri funktionalisointiasteiden seoksia, joita ei

saatu erotettua eikä karakterisoitua. H, K ja F tuloksia vertaillessa, näyttää siltä, että 0,3 M NaCl:n pitoisuudessa reaktio eteni pisimmälle. Geelielektroferogrammin perusteella tuote olisi vähintään 5-funktionalisoitu rakenne, mutta mahdollisesti myös korkeamman funktionalisointiasteen rakenne. Todentaminen vaatisi onnistuneen karakterisoinnin massaspektrometrillä.

2.3.3 PAMAM G1 -ydinrakenteena

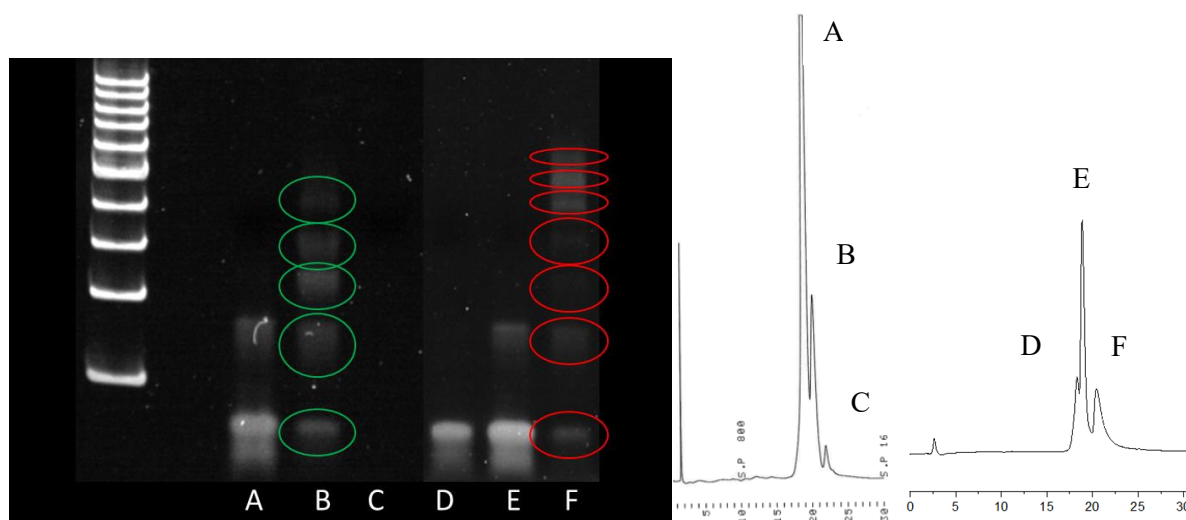


Kaavio 6. PAMAM-ydinrakenteen (3) SNA-synteesi.

PAMAM-G1-SNA:n synteesiä varten käsivarsirakenne (11) liitettiin amidikytkennällä kaupalliseen PAMAM G1-dendrimeeriin (5). Ydinrakenne 3 saostettiin kylmästä dietyylietteristä ja puhdistettiin onnistuneesti HPLC:llä sekä karakterisoitiin massa- ja NMR-spektrometrisesti. Saannoksi määritettiin 2,5 % NMR-karakterisoinnilla 600 MHz Bruker-laitteistolla. Heikosta saannosta huolimatta ydinrakennetta oli tarpeeksi SNA-synteesiä varten.

Monofunktionalisointisynteessissä käytettiin valmistettua ydinrakennetta (**3**) ja tuote **14** HPLC-puhdistettiin. Monofunktionalisoidun tuotteen (**14**) saanto oli 29 %, mutta tuotetta ei onnistuttu karakterisoimaan massaspektrometrisesti. Tuote (**14**) käytettiin kuitenkin seuraavassa reaktiossa. PAMAM G1-SNA-synteessissä ei saatu karakterisoitua haluttua 8 oligonukleotidilla funktionalisoitua SNA-rakennetta (**15**). (Kaavio 6)

Kuvan 11 geelielektroferogrammin perusteella synteeseissä eristettiin usean eri funktionalisointiasteen tuoteseoksia. Jos HPLC-puhdistuksessa kerätty A-fraktio on mono- sekä difunktionalisointi tuotteiden seos, silloin B-fraktio on mahdollisesti usean funktionalisointiasteen tuoteseos. C-fraktion kohdalla ei näy mitään geelielektroferogrammilla. B-fraktion tuoteseokselle toistettiin SPAAC-ligaatio oligonukleotidilla **ON2** ja tuote HPLC-puhdistettiin. Kuvan 11 D-F fraktiot ovat kyseisestä HPLC-puhdistuksesta kerätyt fraktiot. D-fraktio vaikuttaisi olevan pienen funktionalisointiasteen rakenne (mahdollisesti monofunktionalisoitu tuote) ja E-fraktio kahden funktionalisointiasteen tuoteseosta (esimerkiksi mono- sekä difunktionalisoitua SNA-rakennetta).



Kuva 11. Geelielektroferogrammi PAMAM G1-SNA-synteeseille. A, B ja C ovat synteessin ($c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ M}$) HPLC-puhdistuksen fraktioita. D, E ja F ovat uuden synteessin (B-fraktiosta uusi synteesi, $c(\text{NaCl}) = 0,3 \text{ M}$) HPLC-puhdistuksen fraktioita. B ja F ovat mahdollisesti eri funktionalisointiasteiden tuoteseos. Vihreällä on ympyröity B-piikin tuoteseoksen eri funktionalisointiasteita ja punaisella on ympyröity F-fraktion tuoteseoksen eri funktionalisointiasteita. Vasemmalla geelielektroferogrammissa näkyy DNA referenssi 100 – 1000 bp. Oikealla on merkattu HPLC-puhdistusten fraktiot, jotka vastaavat geelielektroferogrammin näytteitä.

Kuvan 11 perusteella B-fraktion tuoteseokselle täysfunktionalisointi-synteessin toistaminen lisäsi ydinrakenteeseen funktionalisoitujen oligonukleotidien määrää. B-fraktion tuoteseos sisältää useita eri funktionalisointiasteen rakenteita, mahdollisesti monofunktionalisoidun lisäksi 2-, 3-, 4-, ja 5-funktionalisoituja SNA-rakenteita. F-fraktiossa on näiden

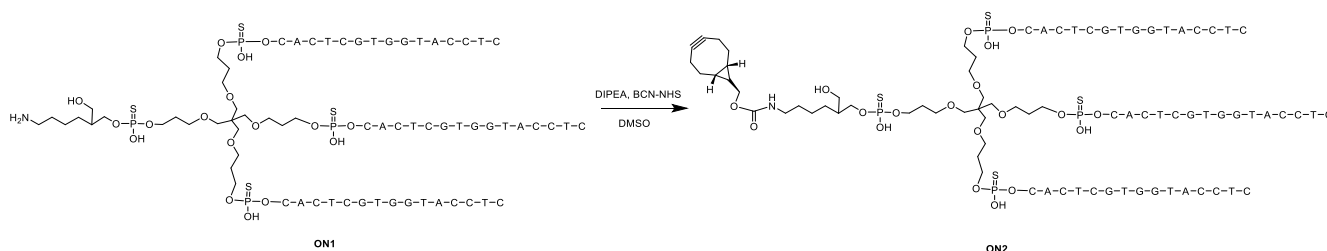
funktionalisointiasteiden lisäksi joko 6- ja 7-funktionalisoituja tai 7- ja 8-funktionalisoituja SNA-rakenteita. HPLC-puhdistuksessa eri tuoterakenteita ei saatu toisistaan erotettua. Ainoastaan pienen funktionalisointiasteen rakenne saatiin tuoteseoksesta erilleen. Kuitenkaan massaspektrometrisesti tuotetta ei saatu karakterisoitua. Homogeenisen SNA-tuotteen valmistamiseksi saattaisi auttaa yksijuosteisen oligonukleotidin käyttö (esimerkiksi **ON4**) monofunktionalisointisynteessissä.

3 Kokeelliset menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Massaspektit mitattiin Waters ACQUITY RDA –massaspektrometrilla. NMR-spektrit mitattiin 500 MHz ja 600 MHz Bruker –laitteistoilla. Geelielektroforeesin mittauksessa käytettiin Novex 6 % TBE–geeliä ja ajo-olosuhteina: 45 mA virtaa sekä 200 V jännitettä. Pallonukleiinihapot ja oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:llä käyttäen aallonpituutta 260 nm. Pallonukleiinihappojen synteeseissä sovellettiin aiemmin julkaistua protokollaa⁶³. PAMAM-ydinrakenteet puhdistettiin HPLC:llä käyttäen aallonpituutta 220 nm. Pallonukleiinihappojen ja oligonukleotidien saannot määritettiin UV-spektrofotometrisesti aallonpituudella 260 nm. SNA-synteesissä käytetty POSS-ydinrakenne (2) oli jo valmistettu tutkimusryhmän laboratoriossa. PAMAM-ydinrakenteiden synteeseissä käytettiin kaupallista 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]jetaanihappoa ja sukupolven 1 (5) dendrimeeriä.

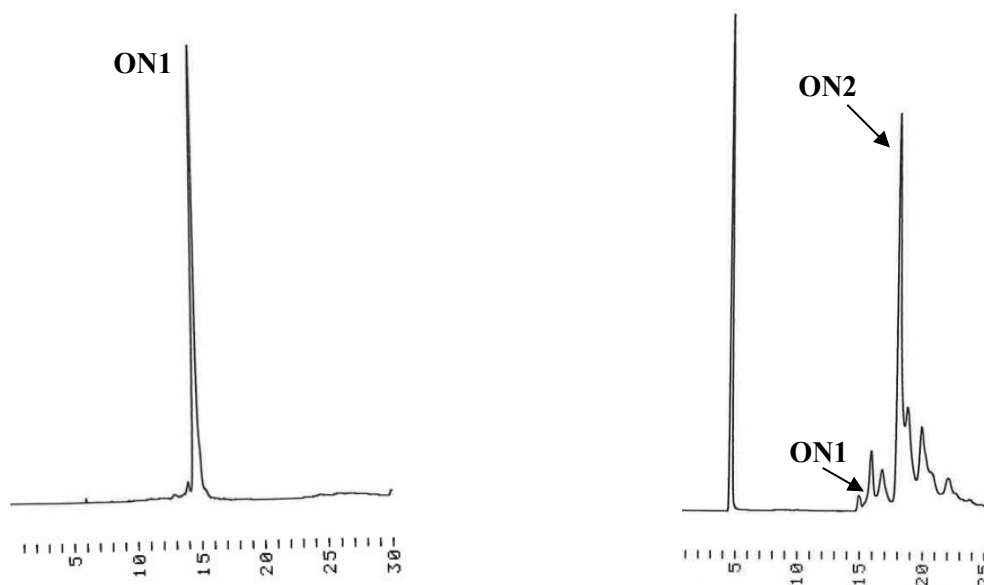
3.2 Oligonukleotidin ON2 syntesi



Kaavio 7. ON1 oligonukleotidiin BCN-rakenteen kiinnitys karbamaattikytkennällä.

Oligonukleotidi (ON1) valmistettiin ÄKTA oligopilot plus automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kaupallisia fosforamidiittirakenneyksiköitä ja 3'-amino-modifier C7 CPG kantajaa. Oligonukleotidi ON1 irrotettiin kantajalta ammonolyysillä. ON1 puhdistettiin RP-HPLC:llä (10 – 30 % 20 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Clarity Oligo-RP (250 x 10 mm, 5 µm) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Tuotteen (ON1) saannoksi määritettiin 0,38 µmol (19 %). Oligonukleotidiin ON1 kiinnitettiin BCN-rakenne. DIPEA (1 µl; 1500 nmol) lisättiin DMSO:iin (28,9 µl) ja BCN-NHS (1,3 mg; 1500 nmol) lisättiin DMSO:iin (22,5 µl). Kylmäkuivattuun oligonukleotidiin (100 nmol) lisättiin DIPEA:n ja BCN-NHS:n DMSO-liuokset ja reaktion annettiin olla huoneenlämmössä. Reaktion etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä. Kolmen päivän jälkeen reaktioseos puhdistettiin RP-HPLC:llä (10 – 35 % 25 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Clarity Oligo-RP (250 x 10 mm, 5 µm) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. ON2 saannoksi määritettiin 41 nmol (41 %).

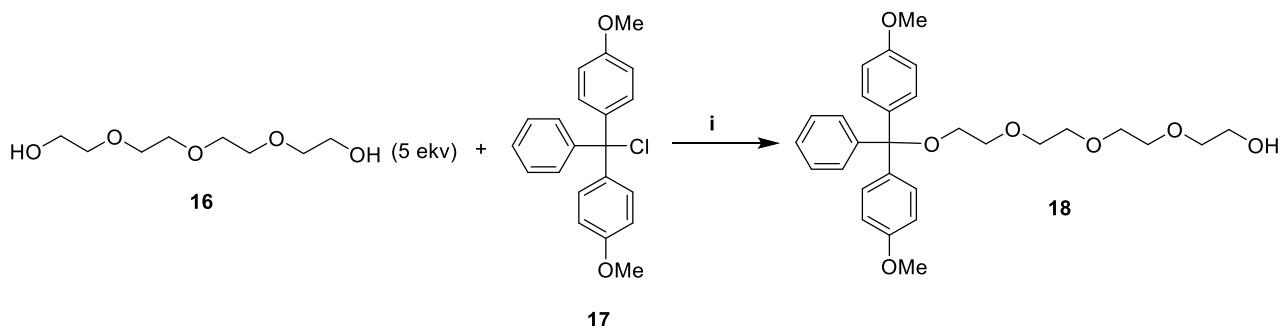
ESI-MS: m/z 3034,93 $[M-5H]^{5-}$ (havaittu) 3034,90 $[M-5H]^{5-}$ (laskettu). [Liite 1]



Kuva 12. ON1 ja ON2 puhdistuksen HPLC-kromatogrammit.

3.3 Oligonukleotidin ON4 synteesi

3.3.1 Tetraetyleeniglykolin (**16**) tritylointi



Kaavio 8. Tetraetyleeniglykolin (**16**) tritylointi tuotteeksi **18**, i: kuiva pyridiini.

Tetraetyleeniglykolia (**16**; 3,57 ml; 20,7 mmol) haihdutettiin kolmesti kuivasta pyridiinistä (3 x 10 ml). Tämän jälkeen se kuivattiin vakuumeiksettaattorissa ja liuotettiin kuivaan pyridiiniin (15 ml). Reaktioliuokseen lisättiin pienessä erissä DMTrCl:ia (**17**; 1,00 g; 2,96 mmol) ja reaktiota sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla, ajoliuksena oli metanolin ja DCM:n seos (5:95, v:v, 0,5 % TEA). Reaktio konsentroidiin ja siihen lisättiin DCM (100 ml). Orgaaninen faasi pestiin kylläisellä NaHCO_3 :lla (3 x 30 ml) ja kylläisellä NaHCO_3 : NaCl -liuoksella (20 ml; 1:3, v:v). Orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti,

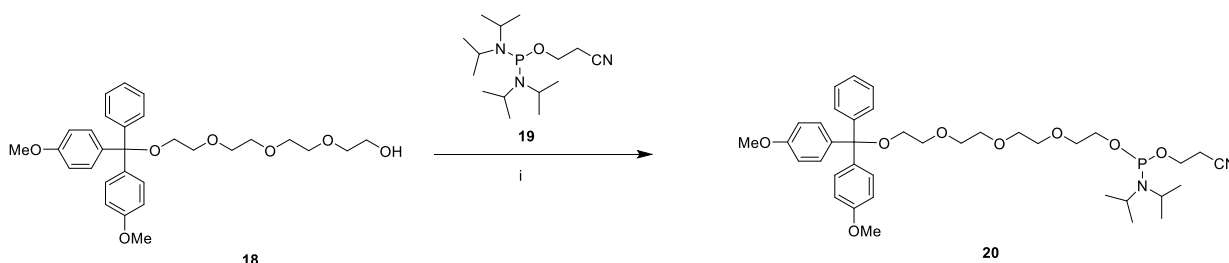
ajoliuoksena käytettiin heksaani:etyyliasetatti-seosta (1:9, v:v, 0,5 % TEA). Tuotteen **18** saannoksi määritettiin 818,5 mg (39,8 %).

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 1,96 (1H, s); 3,15 (2H, t, $J = 5,4$ Hz); 3,51 (2H, t, $J = 5,0$ Hz); 3,62 (12H, m, $J = 4,7$ Hz); 3,70 (6H, s); 6,73 (4H, d, $J = 8,9$ Hz); 7,11 (1H, t, $J = 7,0$ Hz); 7,19 (2H, t, $J = 7,4$ Hz); 7,26 (4H, m, $J = 2,0$ Hz); 7,38 (2H, d, $J = 1,35$ Hz). [Liite 2]

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (500 MHz, CDCl_3): 55,21; 61,91; 63,15; 70,44 – 70,78; 72,52; 85,96; 113,05; 126,66; 127,75; 128,23; 130,08; 136,35; 145,11; 158,40. [Liite 3]

ESI⁺-MS: m/z 534,30 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (havaittu), 534,33 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (laskettu). [Liite 4]

3.3.2 Välituotteen **18** fosfitylointi



Kaavio 9. Tuotteen **18** fosfitylointi reaktio, käyttäen fosforamidiittia **19**, i: tetratsolia, kuivaa asetonitriiliä.

Fosfitylointi tehtiin N_2 -ilmakehässä, jossa vakuumieksikkaattorissa kuivattu **18** (418 μmol , 0,21 g) liuotettiin kuivaan ACN:iin (2 ml). Liuokseen lisättiin fosforamidiittia (**19**; 166,1 μl , 1,3 ekv) ja tetratsoli-liuosta (895 μl , 1 ekv, $c = 0,45$ M ACN:ssä). Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla (ajoliuos MeOH:TEA:DCM: 5:1:94, v:v:v). Reaktioon lisättiin 2 h jälkeen tetratsolia (90 μl , 0,1 ekv). 30 minuuttia tetratsolin lisäyksen jälkeen reaktioon lisättiin fosforamidiittia (**19**, 12,8 μl , 0,1 ekv). Reaktio pysäytettiin kylmällä kylläisellä NaHCO_3 :lla (10 ml) ja sen jälkeen se huuhdeltiin erotussuppiloon kylmällä kylläisellä NaHCO_3 :lla (2 x 10 ml) ja etyyliasetaatilla (3 x 10 ml). Tämän jälkeen etyyliasetaatifaasi otettiin talteen ja sitä pestiin kylläisellä NaHCO_3 :lla (70 ml). Lopuksi vielä yhdistetyt vesifaasit uutettiin etyyliasetaatilla (3 x 30 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Kuivattu tuoteseos puhdistettiin silikageelikromatografisesti, ajoliuoksena oli petrolietterin ja etyyliasetaatin seos (2:1, v:v, puskuri 1 % TEA). Tuotteen **20** saannoksi määritettiin 148 mg (51 %).

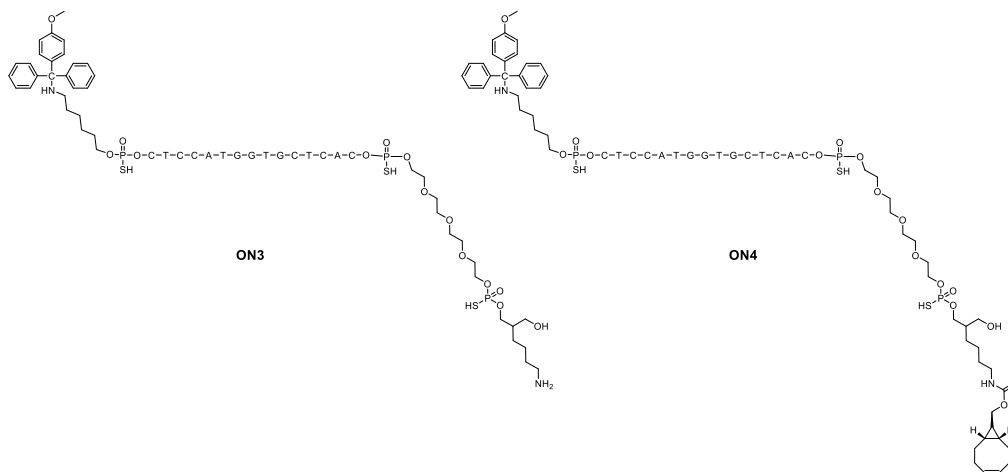
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 1,10 (12H, t, $J = 6,9$ Hz); 1,20 (4H, t, $J = 6,9$ Hz); 2,53 (1H, m, $J = 3,8$ Hz); 2,67 (2H, m, $J = 3,1$ Hz); 3,15 (2H, t, $J = 5,2$ Hz); 3,59 (12H, m, $J = 5,0$ Hz);

3,71 (6H, s); 6,74 (4H, d, $J = 2,1$ Hz); 7,11 (1H, t, $J = 1,7$ Hz); 7,19 (2H, t, $J = 4,4$ Hz); 7,26 (4H, m, $J = 3,1$ Hz); 7,38 (2H, d, $J = 1,3$ Hz). [Liite 5]

^{31}P -NMR δ_{P} (500 MHz, CDCl_3): 148,52 (a). [Liite 6].

ESI⁺MS: m/z 735,32 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (havaittu), 735,45 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (laskettu). [Liite 7]

3.3.3 ON4 synteesi



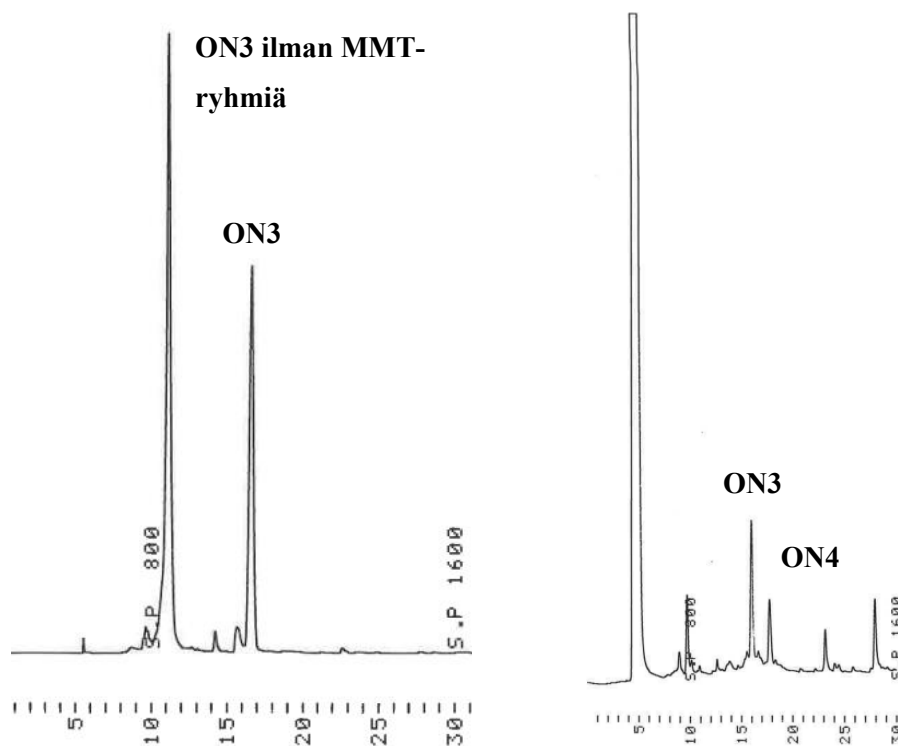
Kuva 13. ON3 ja ON4 rakennekaavat.

Synteesissä käytetystä kiinteästä kantajasta, 3'-amino-modifier C7 CPG:stä (2 μmol , 58,8 mg), poistettiin dimetoksitriityli ÄKTA oligopilot plus automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. Tämän jälkeen kiinteän kantajan synteesi tehtiin typpi-ilmakehässä. Tuote **20** (40 μmol , 27,9 mg, 20 ekv) liuotettiin kuivaan ACN:iin (1 ml) ja joukkoon lisättiin tetratsoli-ACN-liuos (44 μmol , 97,8 μl , 22 ekv). Liuos lisättiin CPG:n joukkoon. Reaktiota sekoitettiin kolonnin läpi ja sen annettiin edetä tunnin ajan. Lopuksi kolonni huuhdeltiin kuivalla ACN:llä ja kuivattiin. Tämän jälkeen suoritettiin sulfurointi 3-fenyyli-1,2,4-ditiazoliini-5-onilla kuivassa ACN:ssä, ja kolonni huuhdeltiin kuivalla ACN:llä. Loput kytkennöistä tehtiin ÄKTA oligopilot plus automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla. **ON3** puhdistettiin RP-HPLC:llä (5 – 95 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Clarity Oligo-RP (250 x 10 mm, 5 μm) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Saannoksi määritettiin 70 nmol (3,5 %). Sitten **ON3**:een liitettiin BCN-rakenne. DIPEA (1 μl) lisättiin DMSO:iin (30,2 μl) ja BCN-NHS (1,2 mg; 1,0 μmol) lisättiin DMSO:iin (20,9 μl). Oligonukleotidin vesiliuokseen (69,6 nmol) lisättiin DIPEA:n ja BCN-NHS:n DMSO-liuokset ja reaktion annettiin olla huoneenlämmössä. Reaktion etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä. Kahden päivän jälkeen reaktioseos puhdistettiin RP-HPLC:llä (5 – 95 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Clarity Oligo-RP

(250 x 10 mm, 5 μ m) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. **ON4** saannoksi määritettiin 0,90 nmol (1,3 %).

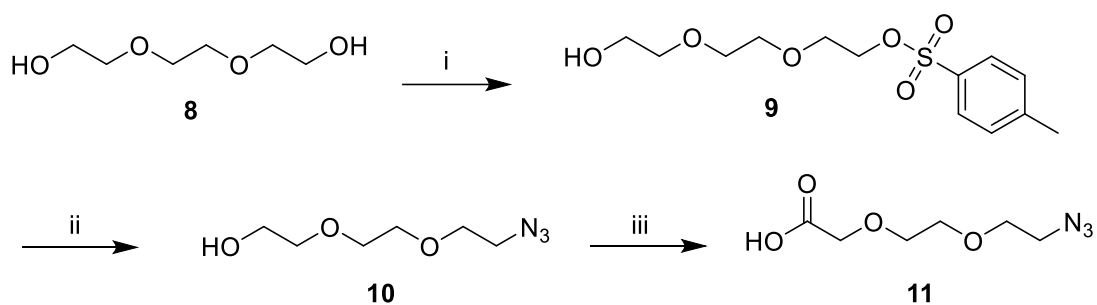
ON3: ESI-MS: m/z 1895,48 [M-3H]³⁻ (havaittu), 1895,57 [M-3H]³⁻ (laskettu). [Liite 8]

ON4: ESI-MS: m/z 1954,17 [M-3H]³⁻ (havaittu), 1954,26 [M-3H]³⁻ (laskettu). [Liite 9]



Kuva 14. ON3 ja ON4 puhdistuksien HPLC-kromatogrammit.

3.4 Käsivarsirakenteen (11) synteesi



Kaavio 10. Käsivarsirakenteen **11** synteesi. i: *p*-tolueenisulfonyylikloridi, TEA, DCM. ii: NaN₃, DMF. iii: CrO₃, H₂SO₄ (aq), asetonii.

3.4.1 2-[2-(2-hydroksietoksi)etoksi]etyyli-4-metyylibentseenisulfonaatin (**9**) synteesi

Yhdiste **9** syntetisoitiin soveltaen aiemmin julkaistua protokollaa¹²⁰. Trietyleeniglykoli (**8**; 1,78 ml; 13,3 mmol) liuotettiin kuivaan DCM:iin (4 ml). Seos jäädytettiin jäävesihauteella ja siihen

lisättiin trietyyliamiinia (0,69 ml; 4,0 mmol). Seokseen lisättiin tipoitain DCM:iin (1 ml) liuotettua *p*-tolueenisulfonyylikloridia (0,5 g; 2,7 mmol) ja tiputussuppilo huuhdeltiin kuivalla DCM:lla (750 µl). Reaktiota seurattiin TLC:lla, ajoliuksena oli etyyliasetaatin ja heksaanin seos (1:1, v:v). Reaktiota sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä ja siihen lisättiin seuraavana päivänä *p*-tolueenisulfonyylikloridia (50 mg; 0,29 mmol). Reaktio pysäytettiin kahden tunnin kuluttua lisäämällä seokseen vettä (10 ml) sekä DCM:ia (5 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä (10 ml) sekä kylläisellä NaCl:lla (2 x 10 ml). Vesifaasit pestiin DCM:lla (10 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuoteseos kuivattiin yön yli vakuumieksikkaattorissa. Kuivattu tuoteseos puhdistettiin silikageelikromatografisesti, ajoliuksena oli metanolin ja DCM:n seos (1:99, v:v). Tuotetta **9** saatiin 0,22 g (5,3 %).

¹H-NMR δ_H(500 MHz, CDCl₃): 2,45 (3H, s); 3,58 (2H, t, *J* = 4,7 Hz); 3,61 (4H, s); 3,71 (4H, t, *J* = 4,6 Hz); 4,17 (2H, t, *J* = 4,7 Hz); 5,31 (OH, s); 7,35 (2H, d, *J* = 8,1 Hz); 7,81 (2H, d, *J* = 8,2 Hz). [Liite 10]

¹³C-NMR δ_C(500 MHz, CDCl₃): 21,64; 61,74; 68,70; 69,18; 70,30; 70,77; 72,47; 127,97; 129,85; 132,94; 144,88. [Liite 11]

3.4.2 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etanolin (**10**) synteesi

Synteesissä hyödynnettiin jo aiemmin julkaistua protokollaa¹²¹. 2-[2-(2-hydroksietoksi)etoksi]etyyli-4-metyyli-bentseenisulfonaatti (**9**; 0,52 g; 1,71 mmol) liuotettiin DMF:iin (6,31 ml) ja seokseen lisättiin NaN₃:ia (0,22 g; 3,42 mol). Seosta lämmitettiin 50 °C yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (ninhydriinivärjäys), ajoliuksena oli etyyliasetaatin ja heksaanin seos (2:1, v:v). Reaktio pysäytettiin lisäämällä seokseen vettä (3,72 ml) ja sen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Tuoteluokseen lisättiin DCM:ia (3 x 5,95 ml) ja orgaanista faasia pestiin vedellä (3 x 4,1 ml). Orgaaniset faasit pestiin kylläisellä NaCl:lla (10 ml), kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote kuivattiin yön yli vakuumieksikkaattorissa. Tuotteen **10** saannoksi määritettiin 0,24 g (80 %).

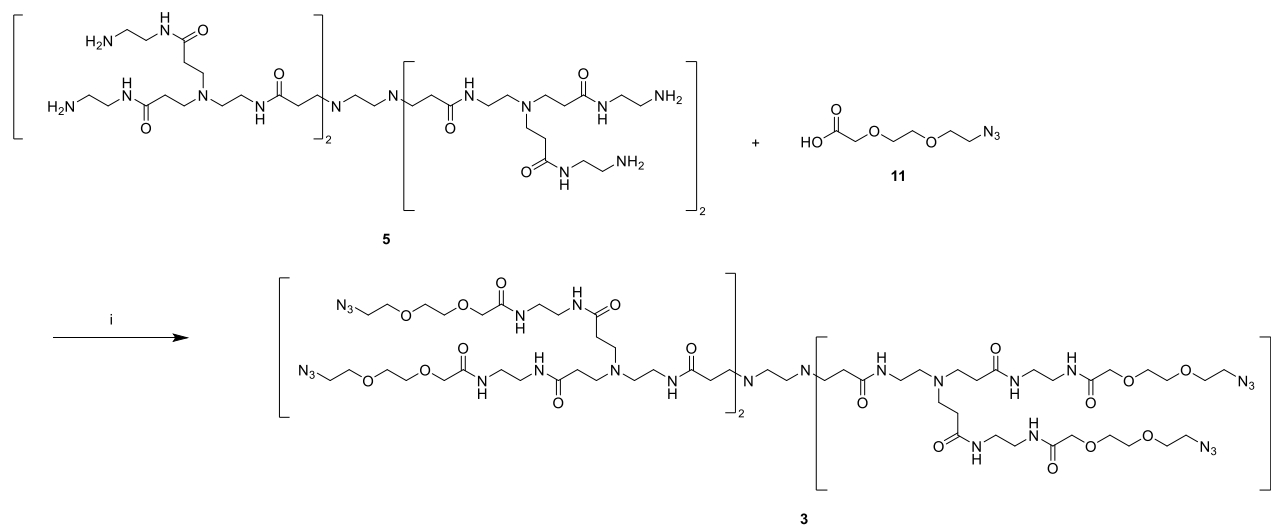
¹H-NMR δ_H(500 MHz, CDCl₃): 3,41 (2H, t, *J* = 5,1 Hz); 3,62 (2H, t, *J* = 4,8 Hz); 3,69 (6H, d, *J* = 7,5 Hz); 3,74 (2H, t, *J* = 4,2 Hz); 5,31 (OH, s). [Liite 12]

¹³C-NMR δ_C(500 MHz, CDCl₃): 50,66; 61,76; 70,04 – 79,66; 72,50. [Liite 13]

3.4.3 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etaanihapon (**11**) synteesi

Synteesissä sovellettiin aiemmin julkaistua protokollaa¹²². 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etanoli (**10**; 80,8 mg; 0,46 mmol) liuotettiin asetoniin (4,66 ml) ja liuos jäädytettiin jäävesihauteella. Seokseen lisättiin tipoitain Jonesin reagenssia (CrO₃ (1,38 mmol) liuotettiin H₂SO₄-vesiliuokseen (76,9 µl)) ja reaktiota sekoitettiin huoneenlämmössä kaksi tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä siihen ensin propan-2-olia (200 µl) ja 15 min kuluttua siihen lisättiin vettä (10 ml). Seoksesta konsentroidiin asetoni pois pyöröhaihduttamalla. Tämän jälkeen jäännökseen lisättiin etyyliasetaattia (80 ml) ja orgaanista faasia pestiin 1 % HCl-vesiliuoksella (2 x 37 ml) sekä kylläisellä NaCl-liuoksella (40 ml). Orgaaniset faasit kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Kuivattu tuoteseos puhdistettiin silikageelikromatografisesti, käyttäen ajoliuoksena gradienttia: 0,5 – 4 % metanolia DCM:ssa. Tuoteseoksesta ei saatu eristettyä tuotetta (**11**) ja osa tuotteesta hajosi vakuumieksikkaattorissa yön aikana.

3.5 PAMAM G1 -ydinrakenteen synteesi



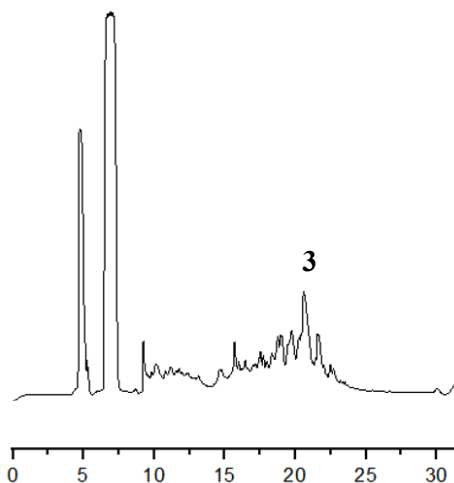
Kaavio 11. SNA ydinrakenteen G1 (**3**) synteesi. Reaktio-olosuhteet i: BOP (13,2 ekv), DIPEA (24 ekv) ja DMSO.

Synteesissä käytettiin kaupallista käsivarsirakennetta (**11**). PAMAM G1 (**5**) –metanoli-liuos kylmäkuivattiin ja haihdutusjäännös kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Kuivatun yhdisteen (**5**; 34 mg; 24 µmol) joukkoon lisättiin kuivaan DMSO:iin (50 µl) liuotettua yhdistettä **11** (54,1 mg; 285 µmol; 12 ekv) ja kuivaan DMSO:iin (150 µl) liuotettua BOP:ia (139 mg; 314 µmol; 13 ekv). Käytetyt mikrosentrifugiputket huuhdeltiin kuivalla DMSO:lla (25 µl). Liuokseen lisättiin DIPEA:ia (99,4 µl; 24 ekv) ja reaktiota ravisteltiin yön yli huoneenlämmössä. Reaktio konsentroidiin ja tuoteseokseen lisättiin TFA:ta (350 µl). Tuoteseos saostettiin kylmästä

dietyylieetterissä kahdesti. Tuoteseos puhdistettiin HPLC:llä (20 – 45 % 25 min, 0,1 % TFA) käyttäen Aeris PEPTIDE XB-C18 (250 x 10 mm, 5 μ m) kolonnia ja detektioaallonpituutta 220 nm. Tuotefraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin. PAMAM G1 ydinrakenteen (**3**) saanto määritettiin NMR:llä käyttäen sisäisenä standardina tunnettua määrää asetonitriilia. Saannoksi määritettiin 590 nmol (2,5 %).

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (600 MHz, D_2O): 2,65 (24H, t, $J = 6,1$ Hz); 3,11 (12H, t, $J = 6,4$ Hz); 3,30 (56H, m, $J = 5,4$ Hz); 3,44 (24H, t, $J = 3,5$ Hz); 3,55 (16H, t, $J = 6,4$ Hz); 3,68 (48H, s); 4,01 (20H, s). [Liite 14]

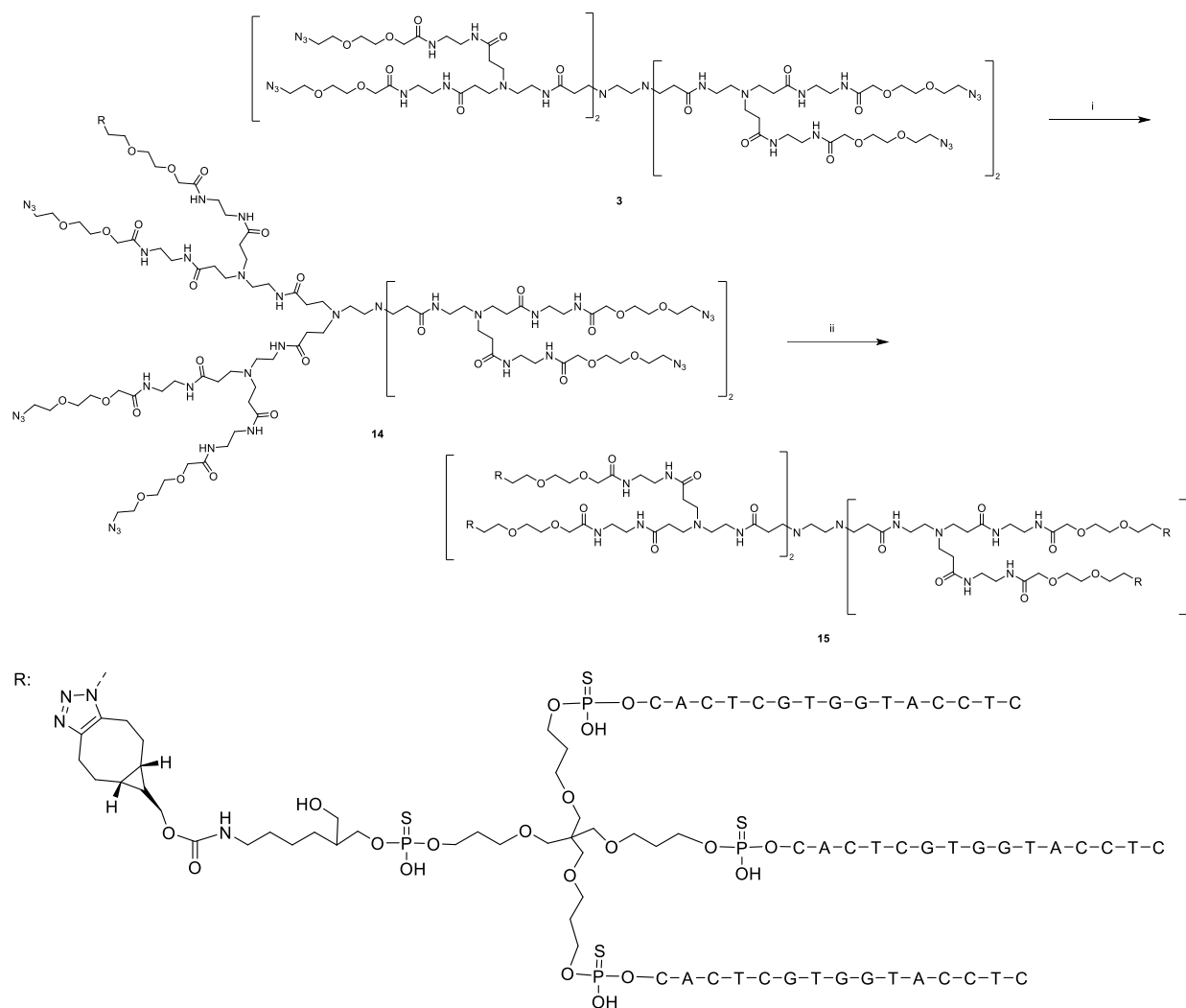
ESI⁺-MS: m/z 1421,79 $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ (havaittu), 1421,75 $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ (laskettu) [Liite 15].



Kuva 15. PAMAM G1-ydinrakenteen (**3**) HPLC-kromatogrammi.

3.6 SNA-synteetit

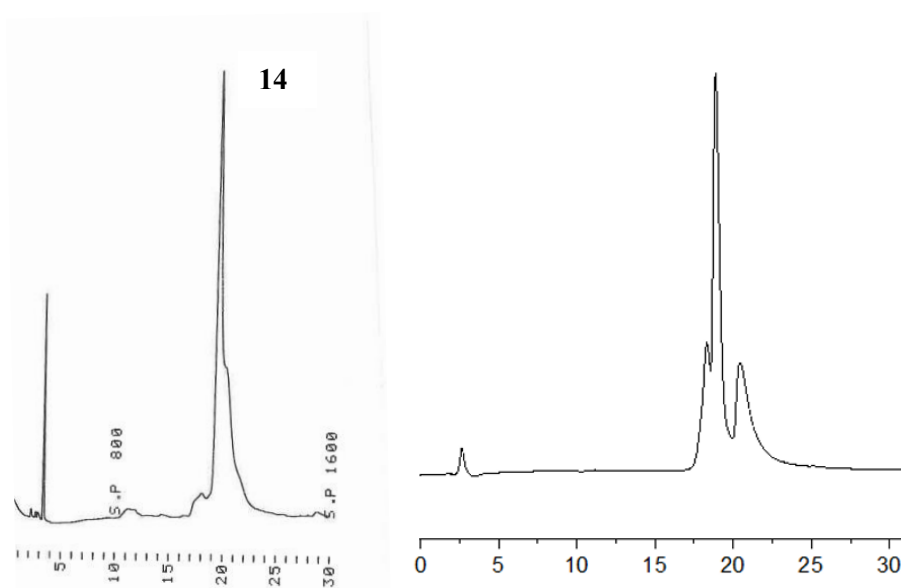
3.6.1 PAMAM G1 -ydinrakenne



Kaavio 12. SNA-synteesi, käyttäen PAMAM G1 (**3**) -ydinrakennetta ja ON2:ia. i: ON2 (1 nmol), DMSO. ii: ON2 (2 nmol), NaCl (0,3 M).

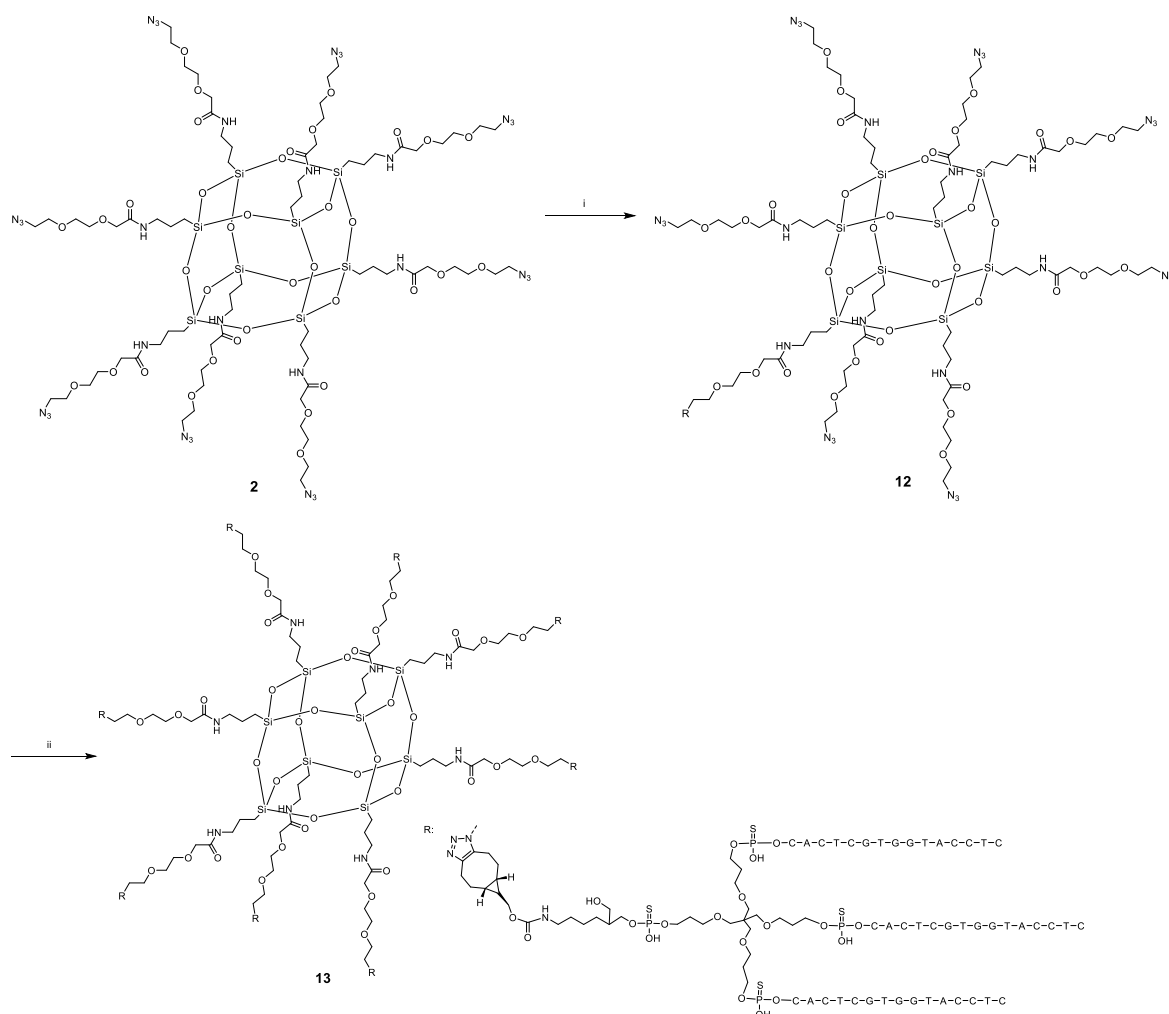
SNA:n monofunktionalisoinnissa ON2-vesiliuokseen (1 nmol; 1 μ l) lisättiin DMSO:ta (5,7 μ l). Lopuksi reaktioliuokseen lisättiin PAMAM G1-ydinrakenne-vesiliuosta (**3**; 3 nmol; 3 μ l) ja reaktion annettiin olla huoneenlämmössä yön yli. Reaktioliuos puhdistettiin HPLC:llä (5 – 65 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen ODS Hypersil (250 x 4,6 mm, 5 μ m) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Tuotteen **14** saannoksi määritettiin 0,29 nmol (29 %). Täysfunktionalisointireaktiossa oligonukleotidin vesiliuokseen (ON2, 5,5 μ l; 2 nmol) lisättiin valmistettua monofunktionalisoitua PAMAM G1-ydinrakennetta vesiliuoksessa (**3**; 40,2 μ l; 0,17 nmol). Lopuksi reaktioon lisättiin NaCl-liuosta (3,3 μ l, kantaliuos c = 4,5 M) ja reaktion annettiin olla kolme päivää huoneenlämmössä. Reaktio puhdistettiin HPLC:llä (5 – 45 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Aeris WIDEPOR XB-C18 (150 x 4,6

mm, 3,6 μ m) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Tuotetta **15** ei saatu karakterisoitua massaspektrometrisesti.



Kuva 16. PAMAM G1-SNA:n monofunktionalisointi tuotteen (**14**) puhdistuksen HPLC-kromatogrammi vasemmalla ja oikealla täysfunktionalisointi tuotteen (**15**) puhdistuksen HPLC-kromatogrammi.

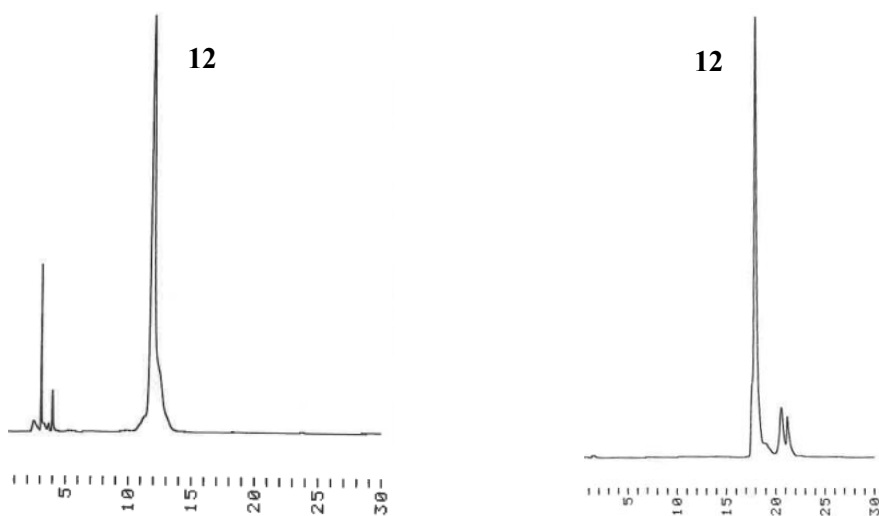
3.6.2 POSS-ydinrakenne



Kaavio 13. SNA synteesi, käyttäen POSS (**2**) -ydinrakennetta ja ON2:ia. i: **ON2** (4 nmol), DMSO. ii: **ON2** (7,2 nmol), NaCl (0,3 M).

Monofunktionalisointireaktiossa **ON2** -vesiliuokseen (4 nmol; 20 µl; 1 ekv) lisättiin DMSO:ta (76 µl). Lopuksi reaktio-oliuokseen lisättiin POSS-ydinrakenne–DMSO–liuosta (**2**; 20 nmol; 4 µl; 5 ekv) ja reaktion annettiin olla huoneenlämmössä yön yli. Reaktio-oliuos puhdistettiin HPLC:llä (20 – 80 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen ODS Hypersil (250 x 4,6 mm, 5µm) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Tuotteen **12** saannoksi määritettiin 2,4 nmol (59 %). Täysfunktionalisointireaktiossa oligonukleotidi-vesiliuokseen (**ON2**, 19,7 µl; 7,2 nmol, 12 ekv) lisättiin valmistettua monofunktionalisoitua POSS-ydinrakennetta (**2**; 6,4 µl; 0,6 nmol). Lopuksi reaktioon lisättiin NaCl-liuosta (5,5 µl, kantaliuos c = 4,5 M) ja reaktion annettiin olla kolme päivää huoneenlämmössä. Reaktio puhdistettiin HPLC:llä (5 – 45 % 30 min, TEAA-puskuri (50 mM, pH = 7)) käyttäen Aeris WIDEPORÉ XB-C18 (150 x 4,6 mm, 3,6 µm) kolonnia ja detektioaallonpituutta 260 nm. Tuotetta **13** ei saatu karakterisoitua massaspektrometrisesti.

Monofunktionalisoitu tuote **12**: ESI-MS: 3486,68 [M-5H]⁵⁻ (havaittu), 3486,67 [M-5H]⁵⁻ (laskettu) [Liite 16].



Kuva 17. Vasemmalla POSS-SNA:n monofunktionalisointi tuotteen (**12**) HPLC-kromatogrammi ja oikealla täysfunktionalisointi tuotteen HPLC-kromatogrammi.

4 Johtopäätökset

Pallonukleiinihapoilla on lineaarisiin oligonukleotideihin verrattuna paljon hyödyllisiä ominaisuuksia. SNA-rakenteen ominaisuuksiin vaikuttavat sekä kuoren oligonukleotidit kuin valittu ydinrakenne. Mahdollisia ydinrakenteita on paljon ja niillä on vaikutusta niin SNA:n pysyvyyteen kuin oligonukleotidien maksimilatausmäärään kuorella. SNA-rakenteilla on paljon potentiaalia toimia kuljettimina erilaisille lääkeyhdisteille, koska ne ovat monipuolinen rakenteiden joukko.

PAMAM G1 (3) sekä POSS (2) –ydinrakenteet soveltuvat SNA:n ytimeksi, mutta niiden vaikutuksista SNA:n biodistributioon ja soluunottoon voidaan todeta vasta *in vitro* ja *in vivo* - tutkimuksissa. POSS-SNA- ja PAMAM-G1-SNA-rakenteet syntetisoitiin kolmihaaraisella **ON2** oligonukleotidilla. Tiheän oligonukleotidikuoren vuoksi modifioituun ydinrakenteeseen jäi vapaita käsiä, joihin oligonukleotidi ei kiinnittynyt. Reaktio-olosuhteiden optimoinnillakaan ei saatu syntetisoitua valmiita SNA-rakenteita, joilla on kahdeksaan ytimen haarakkeeseen funktionalisoitu oligonukleotidit (**ON2**). PAMAM G0 –ytimellä on kahdeksan haarakkeen sijasta neljä haaraketta. Se olisi potentiaalinen SNA-ydin, jonka oligonukleotidikuori mahdollisesti saataisiin täytettyä niin, ettei yhtään ytimen haaraa jäisi vapaaksi.

Jatkotutkimuksen kohteena on monofunktionalisoida oligonukleotidi **ON4** ytimeen, jotta oligonukleotidikuorella olisi paremmin tilaa **ON2** oligonukleotideille. Tavoitteena on syntetisoida valmiit SNA:t, joilla ei ole vapaana yhtäkään ytimen atsidimuokattua haaraketta. Valmiiden SNA-synteesien jälkeen lopullisena tavoitteena olisi selvittää ydinrakenteiden sekä oligonukleotidien vaikutusta pallonukleiinihappojen soluunotossa sekä biodistributiossa.

Lähteet

- (1) Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanomedicine. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363* (25), 2434–2443.
- (2) Zhang, X.-Q.; Xu, X.; Bertrand, N.; Pridgen, E.; Swami, A.; Farokhzad, O. C. Interactions of Nanomaterials and Biological Systems: Implications to Personalized Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1363–1384.
- (3) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. del P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 1–33.
- (4) Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S. Y.; Sood, A. K.; Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 286.
- (5) Rahmanian, N.; Hamishehkar, H.; Dolatabadi, J. E. N.; Arsalani, N. Nano Graphene Oxide: A Novel Carrier for Oral Delivery of Flavonoids. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 331–338.
- (6) Abedi-Gaballu, F.; Dehghan, G.; Ghaffari, M.; Yekta, R.; Abbaspour-Ravasjani, S.; Baradaran, B.; Dolatabadi, J. E. N.; Hamblin, M. R. PAMAM Dendrimers as Efficient Drug and Gene Delivery Nanosystems for Cancer Therapy. *Appl. Mater. today* **2018**, *12*, 177–190.
- (7) Kulkarni, J. A.; Witzigmann, D.; Thomson, S. B.; Chen, S.; Leavitt, B. R.; Cullis, P. R.; van der Meel, R. The Current Landscape of Nucleic Acid Therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16* (6), 630–643.
- (8) Song, Y.; Song, W.; Lan, X.; Cai, W.; Jiang, D. Spherical Nucleic Acids: Organized Nucleotide Aggregates as Versatile Nanomedicine. *Aggregate* **2022**, *3* (1), e120.
- (9) 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.
- (10) Dhar, S.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A.; Lippard, S. J. Polyvalent Oligonucleotide Gold Nanoparticle Conjugates as Delivery Vehicles for Platinum (IV) Warheads. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (41), 14652–14653.
- (11) Song, Y.; Xu, X.; MacRenaris, K. W.; Zhang, X.; Mirkin, C. A.; Meade, T. J. Multimodal Gadolinium-enriched DNA–Gold Nanoparticle Conjugates for Cellular Imaging. *Angew. Chemie* **2009**, *121* (48), 9307–9311.

- (12) Massich, M. D.; Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Ludlow, L. E.; Horvath, C. M.; Mirkin, C. A. Regulating Immune Response Using Polyvalent Nucleic Acid– Gold Nanoparticle Conjugates. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (6), 1934–1940.
- (13) Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. A Thermodynamic Investigation into the Binding Properties of DNA Functionalized Gold Nanoparticle Probes and Molecular Fluorophore Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (37), 12754–12755.
- (14) Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Polyvalent DNA Nanoparticle Conjugates Stabilize Nucleic Acids. *Nano Lett.* **2009**, *9* (1), 308–311.
- (15) Jensen, S. A.; Day, E. S.; Ko, C. H.; Hurley, L. A.; Luciano, J. P.; Kouri, F. M.; Merkel, T. J.; Luthi, A. J.; Patel, P. C.; Cutler, J. I. Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates as an RNAi-Based Therapy for Glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5* (209), 209ra152-209ra152.
- (16) Wang, S.; Qin, L.; Yamankurt, G.; Skakuj, K.; Huang, Z.; Chen, P.-C.; Dominguez, D.; Lee, A.; Zhang, B.; Mirkin, C. A. Rational Vaccinology with Spherical Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (21), 10473–10481.
- (17) Xu, X.; Winterwerber, P.; Ng, D.; Wu, Y. DNA-Programmed Chemical Synthesis of Polymers and Inorganic Nanomaterials. *DNA Nanotechnol. From Struct. to Funct.* **2020**, 57–81.
- (18) Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* (80-.). **2006**, *312* (5776), 1027–1030.
- (19) Bousmail, D.; Amrein, L.; Fakhoury, J. J.; Fakhir, H. H.; Hsu, J. C. C.; Panasci, L.; Sleiman, H. F. Precision Spherical Nucleic Acids for Delivery of Anticancer Drugs. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (9), 6218–6229.
- (20) Radovic-Moreno, A. F.; Chernyak, N.; Mader, C. C.; Nallagatla, S.; Kang, R. S.; Hao, L.; Walker, D. A.; Halo, T. L.; Merkel, T. J.; Rische, C. H. Immunomodulatory Spherical Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (13), 3892–3897.
- (21) Prigodich, A. E.; Randeria, P. S.; Briley, W. E.; Kim, N. J.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A. Multiplexed Nanoflares: mRNA Detection in Live Cells. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (4), 2062–2066.
- (22) Briley, W. E.; Bondy, M. H.; Randeria, P. S.; Dupper, T. J.; Mirkin, C. A. Quantification and Real-Time Tracking of RNA in Live Cells Using Sticky-Flares. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (31), 9591–9595.

- (23) Li, H.; Zhang, B.; Lu, X.; Tan, X.; Jia, F.; Xiao, Y.; Cheng, Z.; Li, Y.; Silva, D. O.; Schrekker, H. S. Molecular Spherical Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (17), 4340–4344.
- (24) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- (25) Cutler, J. I.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (3), 1376–1391.
- (26) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gene Regulation with Polyvalent SiRNA– Nanoparticle Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (6), 2072–2073.
- (27) Hao, L.; Patel, P. C.; Alhasan, A. H.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A. Nucleic Acid– Gold Nanoparticle Conjugates as Mimics of MicroRNA. *Small* **2011**, *7* (22), 3158–3162.
- (28) Chinen, A. B.; Guan, C. M.; Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates Enhance G-Quadruplex Formation and Increase Serum Protein Interactions. *Angew. Chemie* **2015**, *127* (2), 537–541.
- (29) Samanta, D.; Ebrahimi, S. B.; Kusmierz, C. D.; Cheng, H. F.; Mirkin, C. A. Protein Spherical Nucleic Acids for Live-Cell Chemical Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (31), 13350–13355.
- (30) Banga, R. J.; Meckes, B.; Narayan, S. P.; Sprangers, A. J.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A. Cross-Linked Micellar Spherical Nucleic Acids from Thermoresponsive Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (12), 4278–4281.
- (31) Dougan, J. A.; Karlsson, C.; Smith, W. E.; Graham, D. Enhanced Oligonucleotide– Nanoparticle Conjugate Stability Using Thioctic Acid Modified Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (11), 3668–3675.
- (32) Li, Z.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Multiple Thiol-Anchor Capped DNA– Gold Nanoparticle Conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (7), 1558–1562.
- (33) Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G.; Mirkin, C. A. Use of a Steroid Cyclic Disulfide Anchor in Constructing Gold Nanoparticle– Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (2), 289–291.
- (34) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (24), 8313–8318.
- (35) Sun, J.; Curry, D.; Yuan, Q.; Zhang, X.; Liang, H. Highly Hybridizable Spherical

- Nucleic Acids by Tandem Glutathione Treatment and Polythymine Spacing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (19), 12504–12513.
- (36) Chinen, A. B.; Ferrer, J. R.; Merkel, T. J.; Mirkin, C. A. Relationships between Poly (Ethylene Glycol) Modifications on RNA–Spherical Nucleic Acid Conjugates and Cellular Uptake and Circulation Time. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (11), 2715–2721.
- (37) Chinen, A. B.; Guan, C. M.; Ko, C. H.; Mirkin, C. A. The Impact of Protein Corona Formation on the Macrophage Cellular Uptake and Biodistribution of Spherical Nucleic Acids. *Small* **2017**, *13* (16), 1603847.
- (38) Zhang, W.; Meckes, B.; Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acids with Tailored and Active Protein Coronae. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (12), 1983–1990.
- (39) Porcheddu, A.; Giacomelli, G. Peptide Nucleic Acids (PNAs), a Chemical Overview. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (22), 2561–2599.
- (40) Summerton, J.; Weller, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7* (3), 187–195.
- (41) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson–Crick Hydrogen-Bonding Rules. *Nature* **1993**, *365* (6446), 566–568.
- (42) Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. Locked Nucleic Acid–Nanoparticle Conjugates. *ChemBioChem* **2007**, *8* (11), 1230–1232.
- (43) McKenzie, F.; Faulds, K.; Graham, D. Sequence-Specific DNA Detection Using High-Affinity LNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3* (11), 1866–1868.
- (44) 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.
- (45) Cutler, J. I.; Zhang, K.; Zheng, D.; Auyeung, E.; Prigodich, A. E.; Mirkin, C. A. Polyvalent Nucleic Acid Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (24), 9254–9257.
- (46) 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.
- (47) Buonerba, A.; Grassi, A. Trends in Sustainable Synthesis of Organics by Gold Nanoparticles Embedded in Polymer Matrices. *Catalysts* **2021**, *11* (6), 714.
- (48) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in

- Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241* (105), 20–22.
- (49) Yin, Y.; Li, Z.-Y.; Zhong, Z.; Gates, B.; Xia, Y.; Venkateswaran, S. Synthesis and Characterization of Stable Aqueous Dispersions of Silver Nanoparticles through the Tollens Process. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12* (3), 522–527.
- (50) Lee, J.-S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Hurst, S. J.; Mirkin, C. A. Silver Nanoparticle–Oligonucleotide Conjugates Based on DNA with Triple Cyclic Disulfide Moieties. *Nano Lett.* **2007**, *7* (7), 2112–2115.
- (51) Xue, C.; Chen, X.; Hurst, S. J.; Mirkin, C. A. Self-Assembled Monolayer Mediated Silica Coating of Silver Triangular Nanoprisms. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (22), 4071–4074.
- (52) Mitchell, G. P.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (35), 8122–8123.
- (53) Medintz, I. L.; Berti, L.; Pons, T.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Alessandrini, A.; Facci, P.; Mattoussi, H. A Reactive Peptidic Linker for Self-Assembling Hybrid Quantum Dot–DNA Bioconjugates. *Nano Lett.* **2007**, *7* (6), 1741–1748.
- (54) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3+ 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (55) 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.
- (56) Alkilany, A. M.; Murphy, C. J. Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What We Have Learned so Far? *J. nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 2313–2333.
- (57) Banga, R. J.; Chernyak, N.; Narayan, S. P.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A. Liposomal Spherical Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9866–9869.
- (58) Brodin, J. D.; Sprangers, A. J.; McMillan, J. R.; Mirkin, C. A. DNA-Mediated Cellular Delivery of Functional Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (47), 14838–14841.
- (59) Li, Z.; Zhang, Y.; Fullhart, P.; Mirkin, C. A. Reversible and Chemically Programmable Micelle Assembly with DNA Block-Copolymer Amphiphiles. *Nano Lett.* **2004**, *4* (6), 1055–1058.
- (60) Yan, J.; Tan, Y.-L.; Lin, M.; Xing, H.; Jiang, J.-H. A DNA-Mediated Crosslinking Strategy to Enhance Cellular Delivery and Sensor Performance of Protein Spherical Nucleic Acids. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (5), 1803–1809.
- (61) Lv, Y.; Hu, R.; Zhu, G.; Zhang, X.; Mei, L.; Liu, Q.; Qiu, L.; Wu, C.; Tan, W.

- Preparation and Biomedical Applications of Programmable and Multifunctional DNA Nanoflowers. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (10), 1508–1524.
- (62) Ruan, W.; Zheng, M.; An, Y.; Liu, Y.; Lovejoy, D. B.; Hao, M.; Zou, Y.; Lee, A.; Yang, S.; Lu, Y. DNA Nanoclew Templated Spherical Nucleic Acids for siRNA Delivery. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (29), 3609–3612.
- (63) Gulumkar, V.; Aarela, A.; Moisiu, O.; Rahkila, J.; Tahtinen, V.; Leimu, L.; Korsoff, N.; Korhonen, H.; Poijarvi-Virta, P.; Mikkola, S. Controlled Monofunctionalization of Molecular Spherical Nucleic Acids on a Buckminster Fullerene Core. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (6), 1130–1138.
- (64) Baney, R. H.; Itoh, M.; Sakakibara, A.; Suzuki, T. Silsesquioxanes. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (5), 1409–1430.
- (65) Li, G.; Wang, L.; Ni, H.; Pittman, C. U. Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) Polymers and Copolymers: A Review. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2001**, *11*, 123–154.
- (66) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951.
- (67) 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.
- (68) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1547–1562.
- (69) Su, K.-H.; Wei, Q.-H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.* **2003**, *3* (8), 1087–1090.
- (70) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science (80-.)*. **1997**, *277* (5329), 1078–1081.
- (71) Leff, D. V.; Brandt, L.; Heath, J. R. Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines. *Langmuir* **1996**, *12* (20), 4723–4730.
- (72) Galow, T. H.; Boal, A. K.; Rotello, V. M. A “Building Block” Approach to Mixed-Colloid Systems Through Electrostatic Self-Organization. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (8), 576–579.
- (73) Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Sequence-Dependent

- Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18* (17), 6666–6670.
- (74) Azar, N. T. P.; Mutlu, P.; Khodadust, R.; Gunduz, U. Poly Amidoamine PAMAM Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications. *Hacettepe J. Biol. Chem.* **2013**, *41* (3), 289–299.
- (75) Jana, S.; Gandhi, A.; Sen, K. K.; Basu, S. K. Dendrimers: Synthesis, Properties, Biomedical and Drug Delivery Applications. *Am J Pharm Tech Res* **2012**, *2*, 32–55.
- (76) Trivedi, V.; Patel, U.; Bhimani, B.; Daslaniya, D.; Patel, G.; Vyas, B. Dendrimer: Polymer of 21st Century. *IJPRBS J.* **2012**, *1* (2), 1–21.
- (77) Waite, C. L.; Roth, C. M. PAMAM-RGD Conjugates Enhance SiRNA Delivery through a Multicellular Spheroid Model of Malignant Glioma. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (10), 1908–1916.
- (78) Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker Jr, J. R. The Use of PAMAM Dendrimers in the Efficient Transfer of Genetic Material into Cells. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3* (7), 232–245.
- (79) Janaszewska, A.; Ciolkowski, M.; Wróbel, D.; Petersen, J. F.; Ficker, M.; Christensen, J. B.; Bryszewska, M.; Klajnert, B. Modified PAMAM Dendrimer with 4-Carbomethoxypyrrolidone Surface Groups Reveals Negligible Toxicity against Three Rodent Cell-Lines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9* (4), 461–464.
- (80) Esfand, R.; Tomalia, D. A. Poly (Amidoamine)(PAMAM) Dendrimers: From Biomimicry to Drug Delivery and Biomedical Applications. *Drug Discov. Today* **2001**, *6* (8), 427–436.
- (81) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17* (1), 117–132.
- (82) Peterson, J.; Ebber, A.; Allikmaa, V.; Lopp, M. Synthesis and CZE Analysis of PAMAM Dendrimers with an Ethylenediamine Core. In *Proceedings-Estonian Academy of Sciences Chemistry*; TRUEKITUD OU, 2001; Vol. 50, pp 156–166.
- (83) Braun, C. S.; Vetro, J. A.; Tomalia, D. A.; Koe, G. S.; Koe, J. G.; Middaugh, C. R. Structure/Function Relationships of Polyamidoamine/DNA Dendrimers as Gene Delivery Vehicles. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94* (2), 423–436.
- (84) Tomalia, D. A. Birth of a New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Blocks for Nanoscale Synthetic Polymer Chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30* (3–4), 294–324.
- (85) Walter, M. V; Malkoch, M. Simplifying the Synthesis of Dendrimers: Accelerated

- Approaches. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (13), 4593–4609.
- (86) Inoue, K. Functional Dendrimers, Hyperbranched and Star Polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25* (4), 453–571.
- (87) Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box. *Science (80-.)*. **1994**, *266* (5188), 1226–1229.
- (88) Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard III, W. A. Starburst Dendrimers: Molecular-level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29* (2), 138–175.
- (89) Sayed-Sweet, Y.; Hedstrand, D. M.; Spinder, R.; Tomalia, D. A. Hydrophobically Modified Poly (Amidoamine)(PAMAM) Dendrimers: Their Properties at the Air–Water Interface and Use as Nanoscopic Container Molecules. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7* (7), 1199–1205.
- (90) Ciolkowski, M.; Petersen, J. F.; Ficker, M.; Janaszewska, A.; Christensen, J. B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. Surface Modification of PAMAM Dendrimer Improves Its Biocompatibility. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (6), 815–817.
- (91) Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D’emanuele, A. The Influence of Surface Modification on the Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252* (1–2), 263–266.
- (92) Hong, S.; Bielinska, A. U.; Mecke, A.; Keszler, B.; Beals, J. L.; Shi, X.; Balogh, L.; Orr, B. G.; Baker Jr, J. R.; Banaszak Holl, M. M. Interaction of Poly (Amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport. *Bioconj. Chem.* **2004**, *15* (4), 774–782.
- (93) Yang, H.; Kao, W. J. Synthesis and Characterization of Nanoscale Dendritic RGD Clusters for Potential Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2007**, *2* (1), 89–99.
- (94) Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. Dendrimer Toxicity: Let’s Meet the Challenge. *Int. J. Pharm.* **2010**, *394* (1–2), 122–142.
- (95) Canceill, J.; Chambron, J.-C.; Collet, A.; Dietrich-Buchecker, C.; Durst, H. D.; Dutasta, J.-P.; Kohnke, F. H.; Lozach, B.; Mathias, J.-P.; Misumi, S. Genealogically Directed Synthesis: Starburst/Cascade Dendrimers and Hyperbranched Structures. *Supramol. Chem. I—Directed Synth. Mol. Recognit.* **1993**, 193–313.
- (96) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am.*

- Chem. Soc.* **1990**, *112* (21), 7638–7647.
- (97) Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S. Double Exponential Dendrimer Growth. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (8), 2159–2165.
- (98) Medina, S. H.; El-Sayed, M. E. H. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (7), 3141–3157.
- (99) Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (40), 12809–12818.
- (100) Lee, J. W.; Kim, M.; Kim, J. H.; Kim, B.-K.; Kim, J. H.; Shin, W. S. Convergent Synthesis of PAMAM-like Dendrimers from Azide-Functionalized PAMAM Dendrons. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27* (11), 1795–1800.
- (101) Lee, J. W.; Kim, J. H.; Kim, H. J.; Han, S. C.; Kim, J. H.; Shin, W. S.; Jin, S.-H. Synthesis of Symmetrical and Unsymmetrical PAMAM Dendrimers by Fusion between Azide- and Alkyne-Functionalized PAMAM Dendrons. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (2), 579–584.
- (102) Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Efficiency and Fidelity in a Click-chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper (I)-catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angew. Chemie* **2004**, *116* (30), 4018–4022.
- (103) Wu, P.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G.; Fokin, V. V. Multivalent, Bifunctional Dendrimers Prepared by Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2005**, No. 46, 5775–5777.
- (104) Wang, H.; Shi, H.-B.; Yin, S.-K. Polyamidoamine Dendrimers as Gene Delivery Carriers in the Inner Ear: How to Improve Transfection Efficiency. *Exp. Ther. Med.* **2011**, *2* (5), 777–781.
- (105) Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. Dendrimers and Dendritic Polymers in Drug Delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (1), 35–43.
- (106) Sharma, A.; Porterfield, J. E.; Smith, E.; Sharma, R.; Kannan, S.; Kannan, R. M. Effect of Mannose Targeting of Hydroxyl PAMAM Dendrimers on Cellular and Organ Biodistribution in a Neonatal Brain Injury Model. *J. Control. Release* **2018**, *283*, 175–189.
- (107) Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene. *Science* (80-.). **1987**, *235* (4785), 177–182.

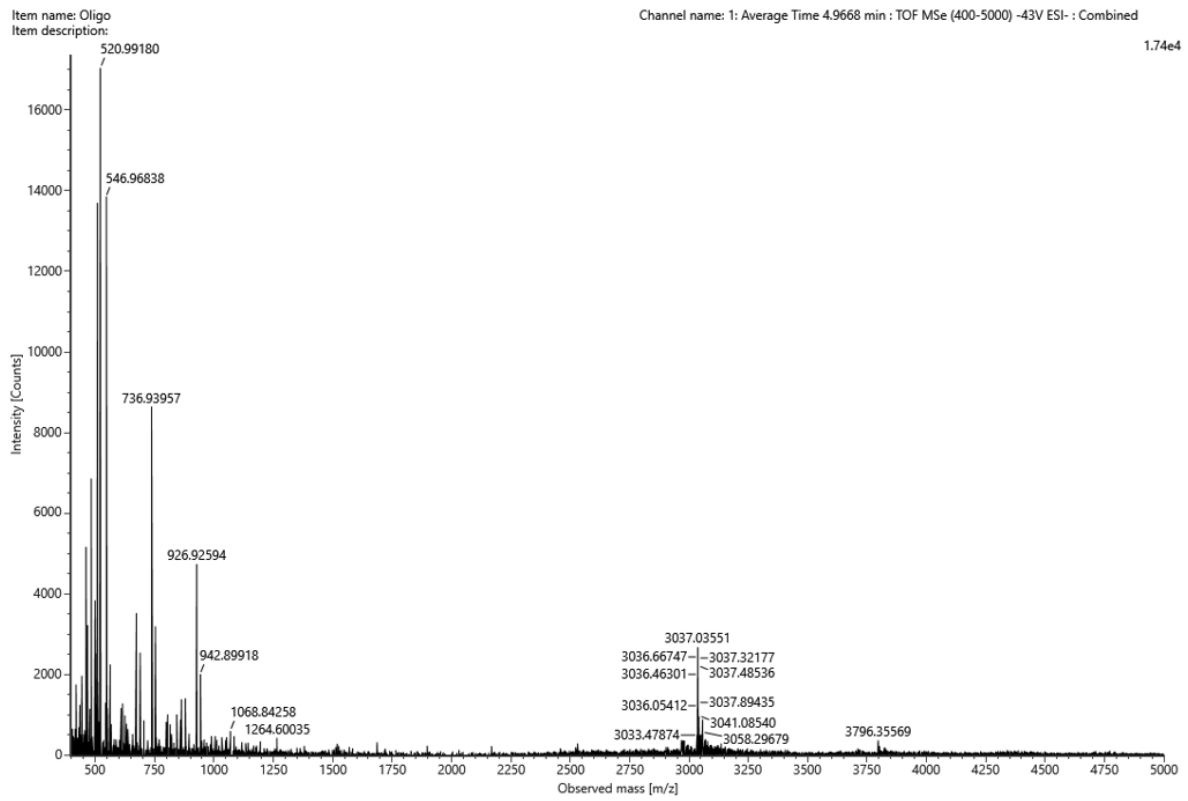
- (108) Yaziji, H.; Goldstein, L. C.; Barry, T. S.; Werling, R.; Hwang, H.; Ellis, G. K.; Gralow, J. R.; Livingston, R. B.; Gown, A. M. HER-2 Testing in Breast Cancer Using Parallel Tissue-Based Methods. *Jama* **2004**, *291* (16), 1972–1977.
- (109) Hynes, N. E.; Lane, H. A. ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (5), 341–354.
- (110) Baselga, J.; Swain, S. M. Novel Anticancer Targets: Revisiting ERBB2 and Discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (7), 463–475.
- (111) Senkus, E.; Cardoso, F.; Pagani, O. Time for More Optimism in Metastatic Breast Cancer? *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40* (2), 220–228.
- (112) Figueroa-Magalhães, M. C.; Jelovac, D.; Connolly, R. M.; Wolff, A. C. Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *The Breast* **2014**, *23* (2), 128–136.
- (113) Kulhari, H.; Pooja, D.; Shrivastava, S.; Kuncha, M.; Naidu, V. G. M.; Bansal, V.; Sistla, R.; Adams, D. J. Trastuzumab-Grafted PAMAM Dendrimers for the Selective Delivery of Anticancer Drugs to HER2-Positive Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 23179.
- (114) Pinto, A. C.; Ades, F.; de Azambuja, E.; Piccart-Gebhart, M. Trastuzumab for Patients with HER2 Positive Breast Cancer: Delivery, Duration and Combination Therapies. *The Breast* **2013**, *22*, S152–S155.
- (115) Zhao, P.; Astruc, D. Docetaxel Nanotechnology in Anticancer Therapy. *ChemMedChem* **2012**, *7* (6), 952–972.
- (116) Bielinska, A. U.; Chen, C.; Johnson, J.; Baker, J. R. DNA Complexing with Polyamidoamine Dendrimers: Implications for Transfection. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (5), 843–850.
- (117) Shchepinov, M. S.; Udalova, I. A.; Bridgman, A. J.; Southern, E. M. Oligonucleotide Dendrimers: Synthesis and Use as Polylabelled DNA Probes. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (22), 4447–4454.
- (118) Heuer-Jungemann, A.; Kiessling, L.; Stratakis, E.; Kymakis, E.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Kanaras, A. G. Supporting Information for Programming the Assembly of Gold Nanoparticles on Graphene Oxide Sheets Using DNA.
- (119) 5'-Amino-Modifier C6 <https://www.glenresearch.com/thiol-modifiers/10-1906.html> (accessed Oct 26, 2023).
- (120) NEt2MeI, A.; Photoisomerization, A. Photo-Controlled Interactions of Azobenzene Micelle Derivatives with Antimicrobial Peptides.
- (121) Wu, X.; Ni, M.; Xia, W.; Hu, X.-Y.; Wang, L. A Novel Dynamic Pseudo [1] Rotaxane

Based on a Mono-Biotin-Functionalized Pillar [5] Arene. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2* (9), 1013–1017.

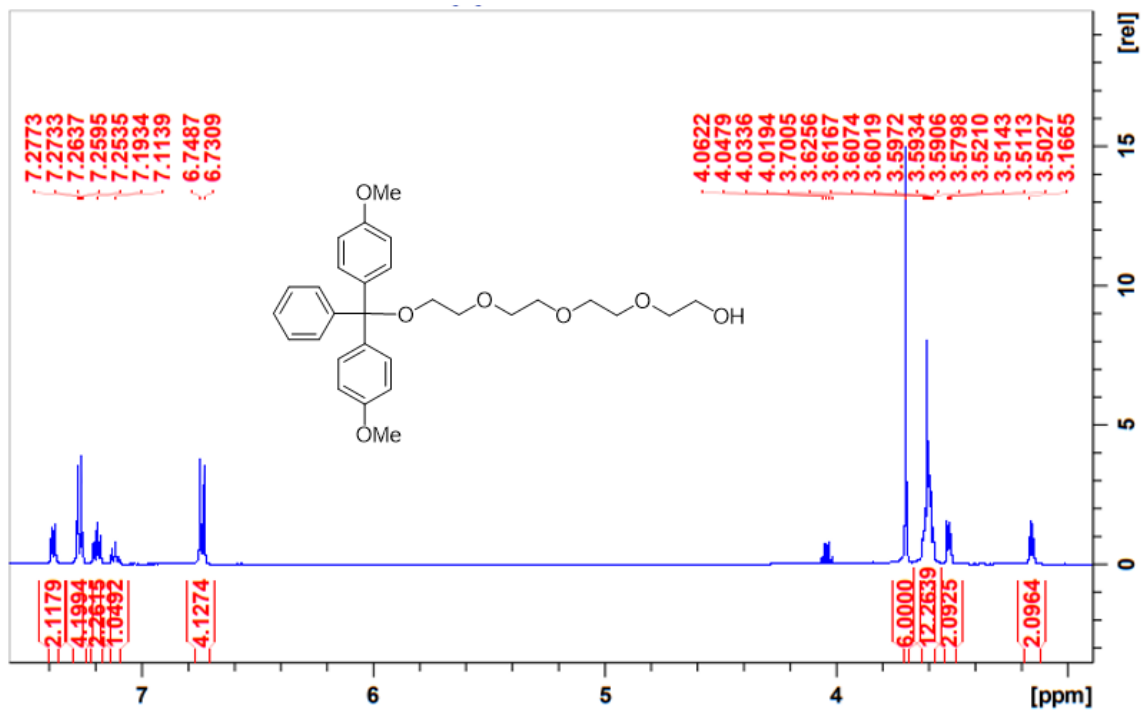
- (122) Clave, G.; Boutal, H.; Hoang, A.; Perraut, F.; Volland, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. A Novel Heterotrifunctional Peptide-Based Cross-Linking Reagent for Facile Access to Bioconjugates. Applications to Peptide Fluorescent Labelling and Immobilisation. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (17), 3065–3078.

Liitteet

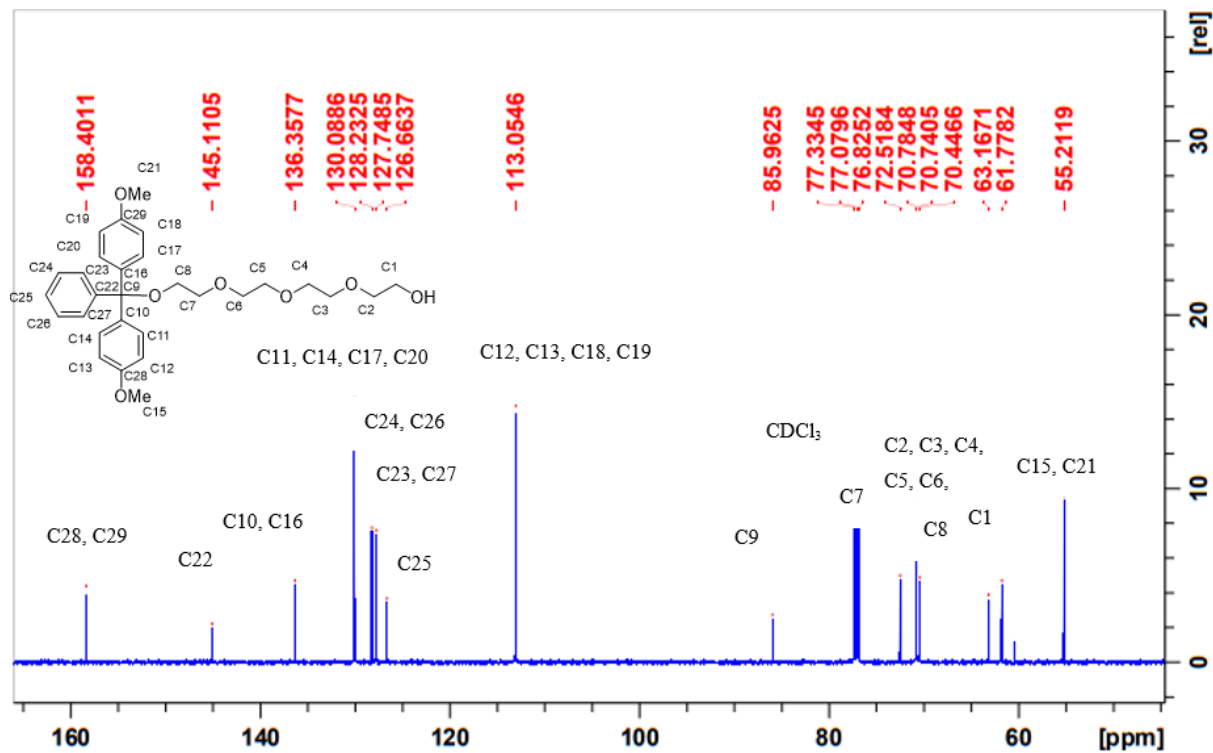
Liite 1. Oligonukleotidin ON2 massaspektri.



Liite 2. DMTrTetraEG (18) tuotteen ¹H-NMR.

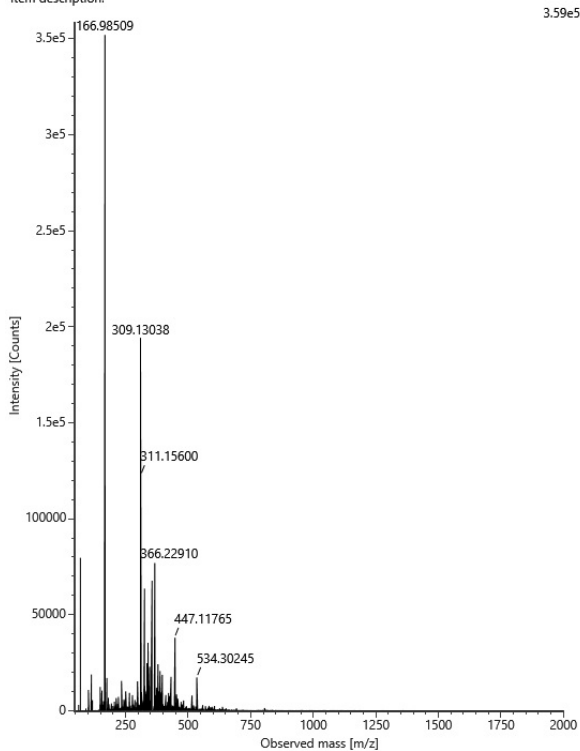


Liite 3. DMTrTetraEG (18) tuotteen ^{13}C -NMR.

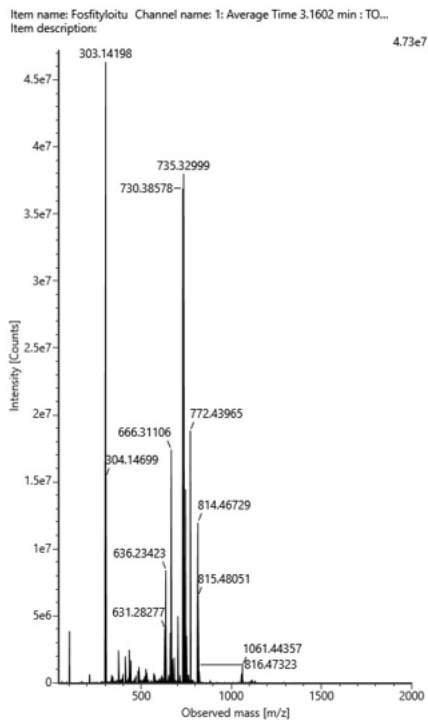


Liite 4. DMTrTetraEG (18) tuotteen massaspektri.

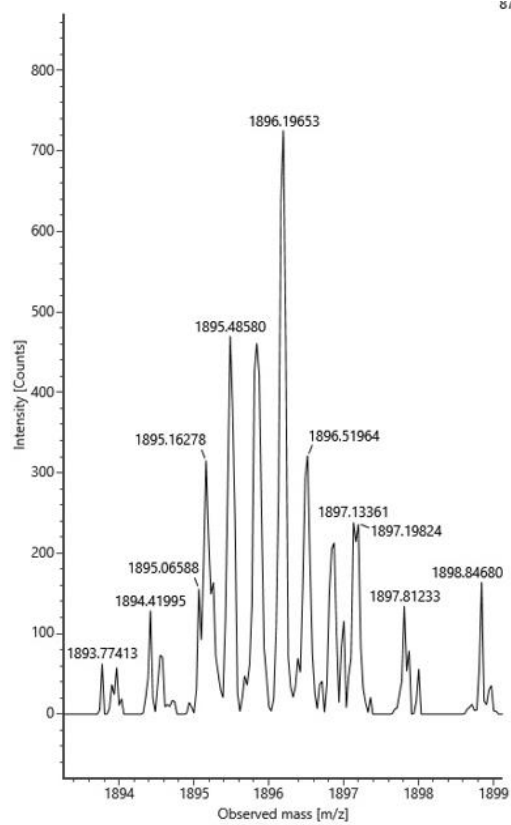
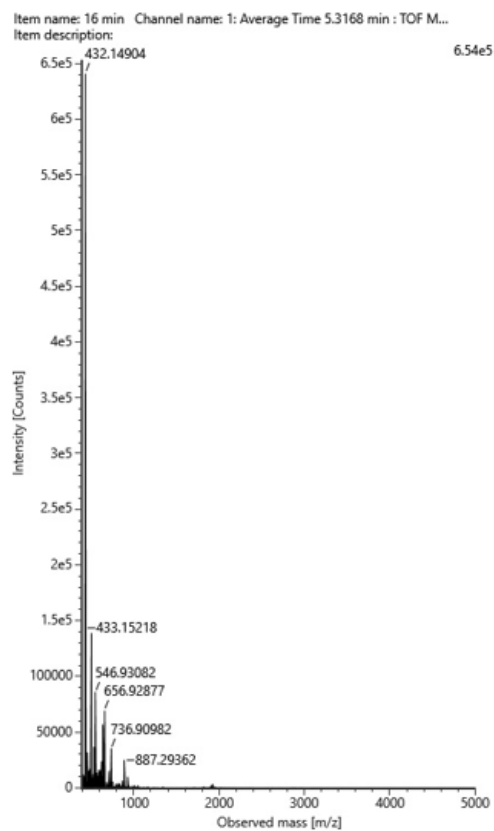
Item name: nayte Channel name: 1: Average Time 2.8668 min : TOF MSe (50-2000) -40V ESI-...
Item description:



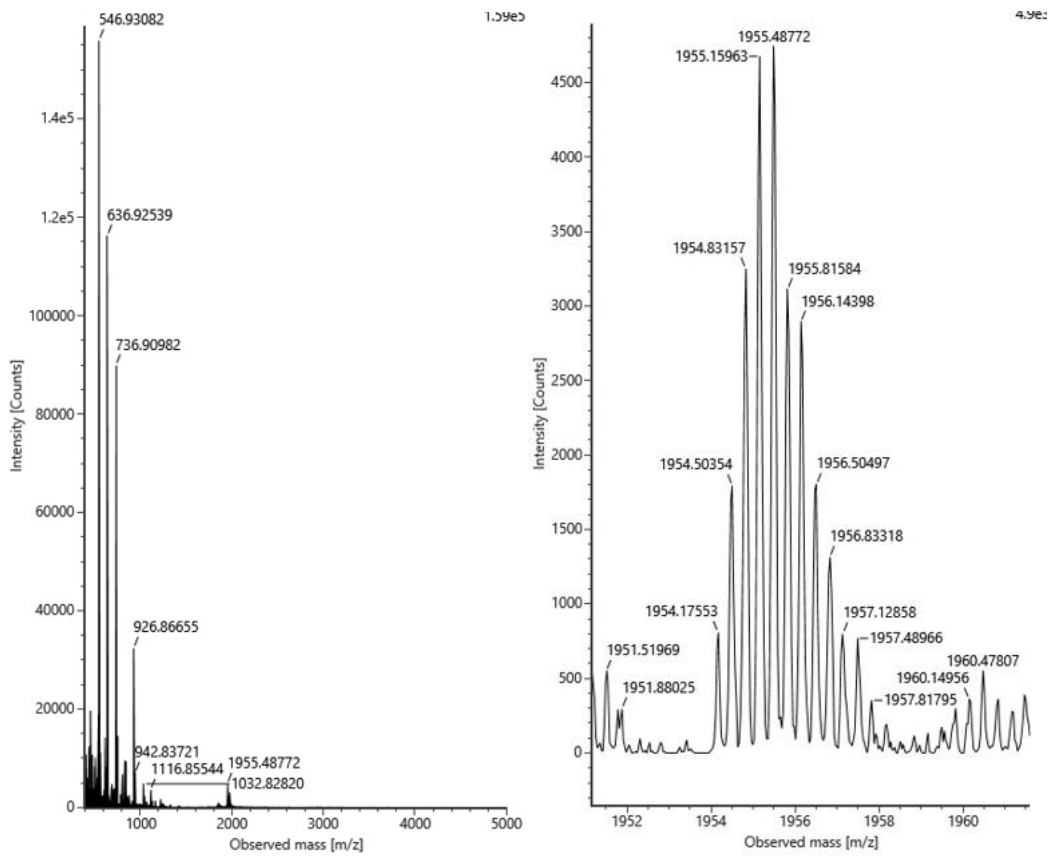
Liite 7. Fosfityloidun tuotteen 20 massaspektri.



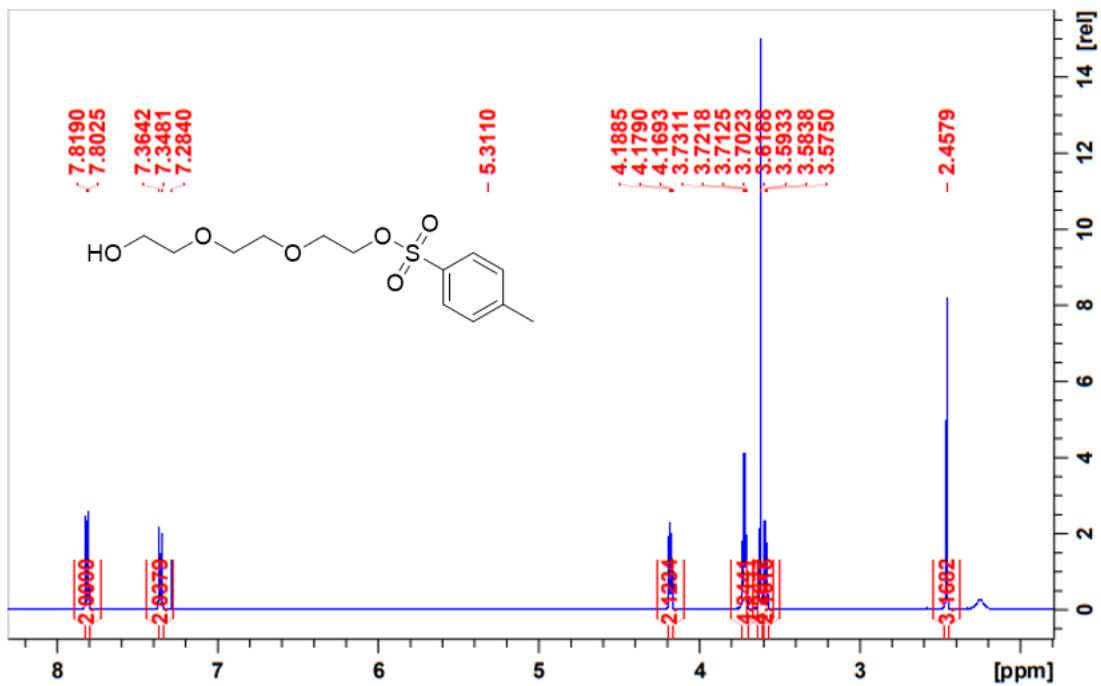
Liite 8. Oligonukleotidin ON3 massaspektri.



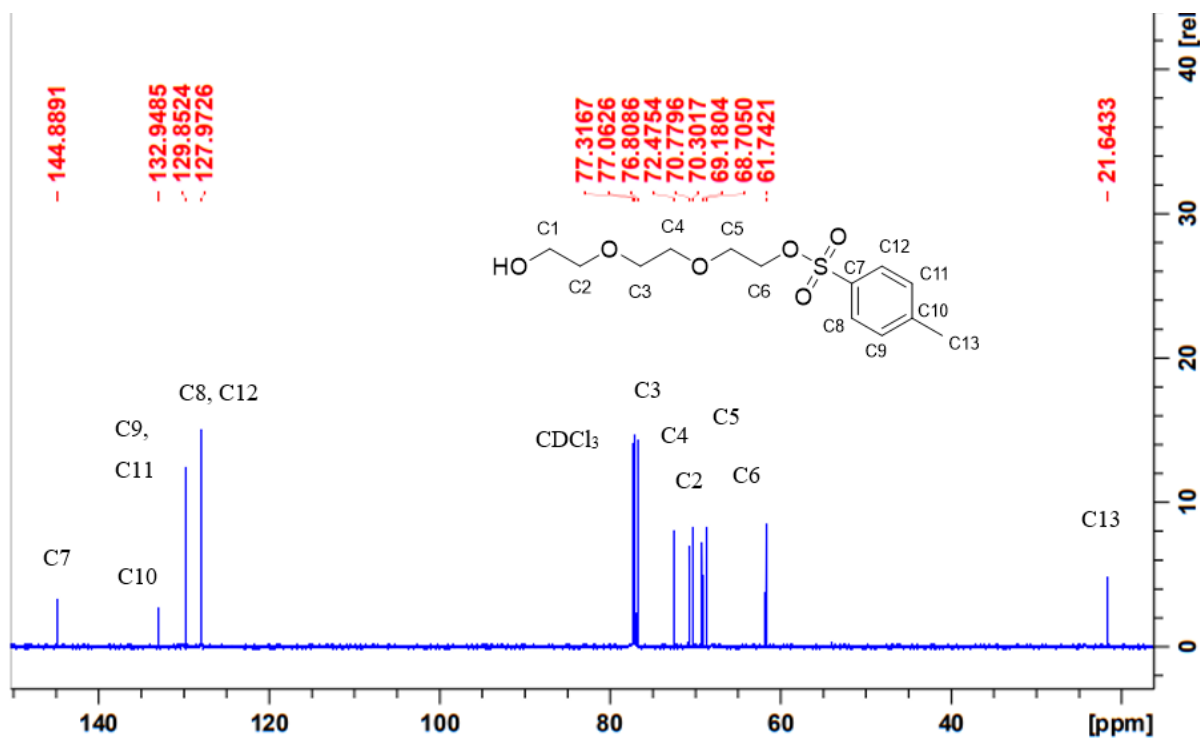
Liite 9. Oligonukleotidin ON4 massaspektri.



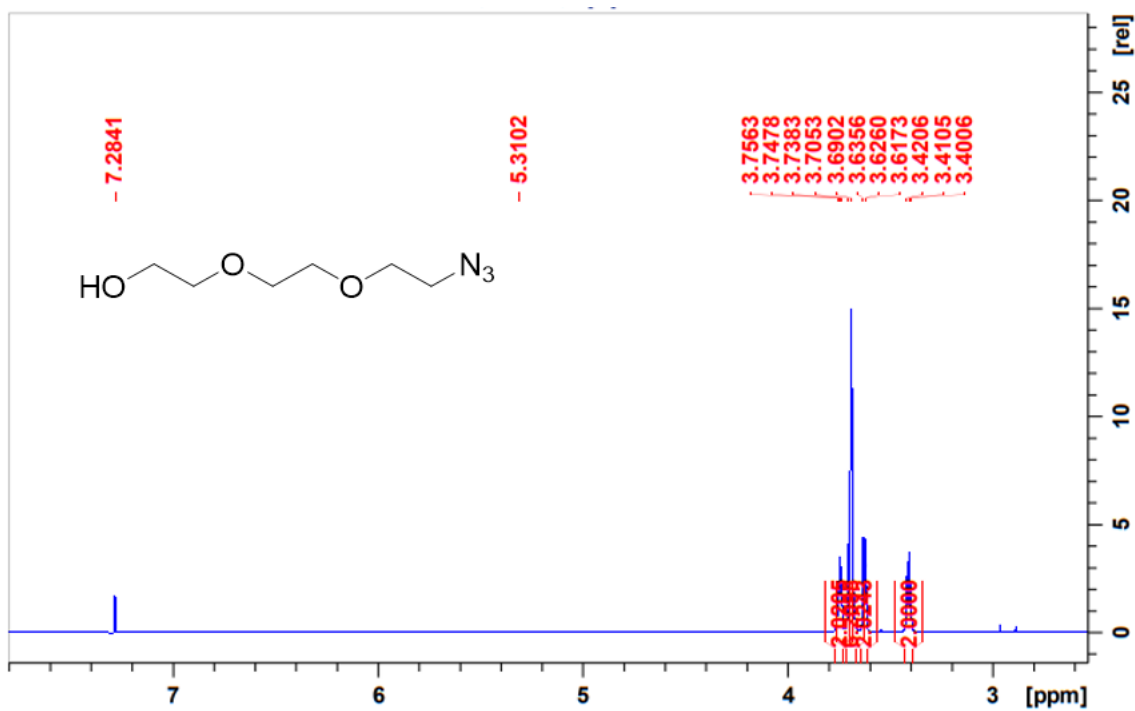
Liite 10. 2-[2-(2-hydroksietoksi)etoksi]etyyli-4-metyylibentseenisulfoonaatin (9) ¹H-NMR.

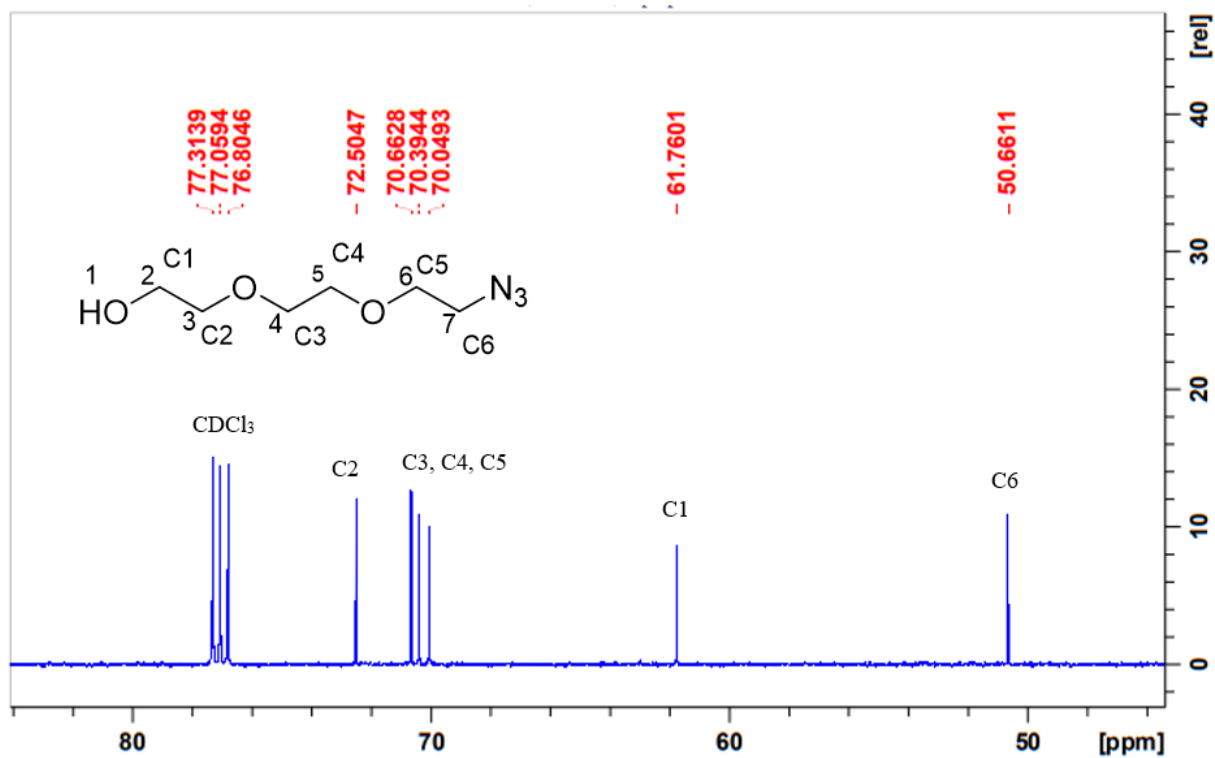
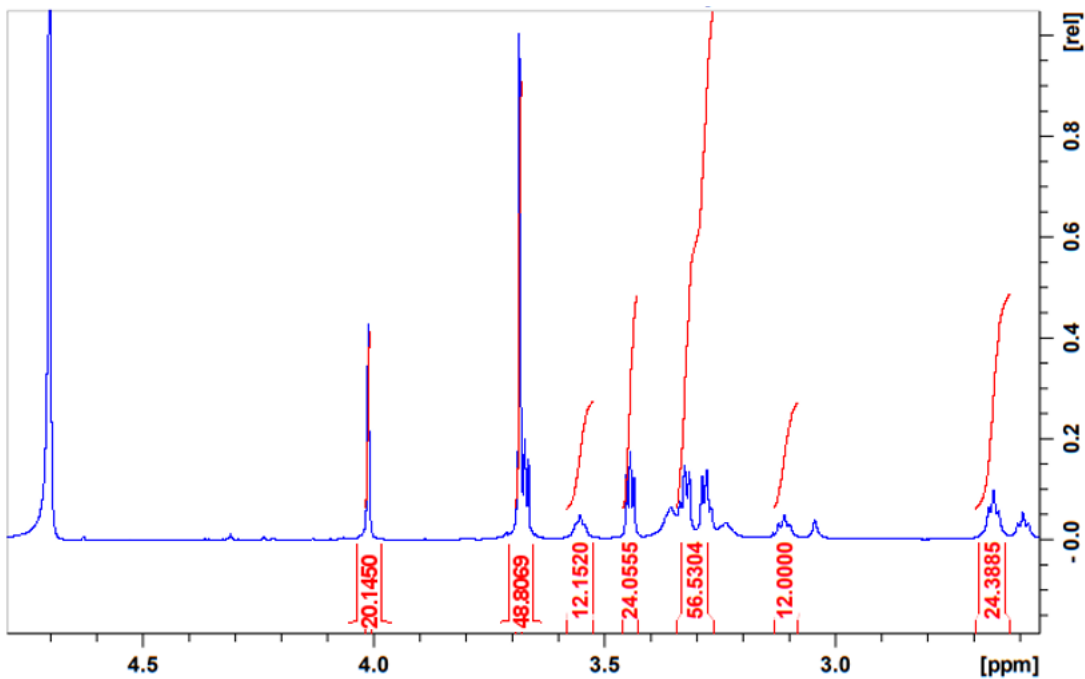


Liite 11. 2-[2-(2-hydroksietoksi)etoksi]etyyli-4-metyylibentseenisulfonaatin (9) ^{13}C -NMR.

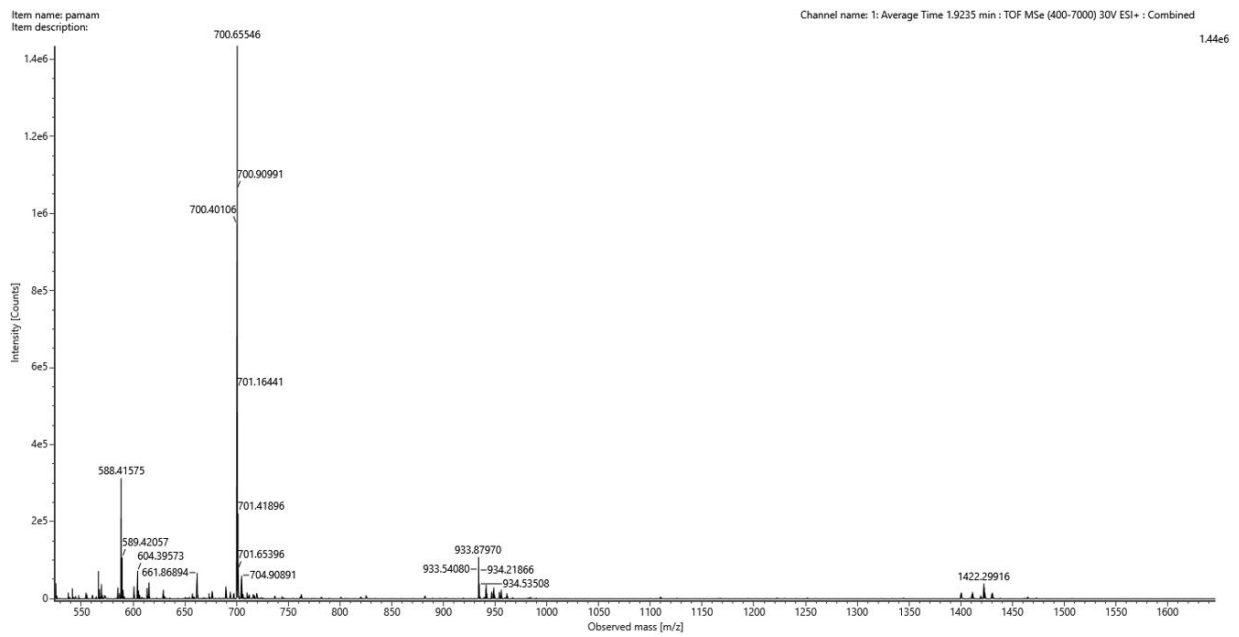


Liite 12. 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etanolin (10) ^1H -NMR.



Liite 13. 2-[2-(2-atsidoetoksi)etoksi]etanolin (10) ^{13}C -NMR.Liite 14. PAMAM G1 ydinrakenteen (3) ^1H -NMR.

Liite 15. PAMAM G1 ydinrakenteen (3) massaspektri.



Liite 16. POSS monofunktionalisointi tuotteen 12 massaspektri.

