

Sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatit

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian osasto

4.7.2012

Minna Tolonen

TIIVISTELMÄ

Tämän työn kirjallisen osion tarkoituksena on esitellä sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatteja ja niiden synteettistä valmistusta sekä perehtyä niiden erilaisiin käyttömahdollisuuksiin. Sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaateista valmistetut makrosykliset rakenteet voivat toimia mm. rakenneosina lääkekehityksessä, materiaalikemiassa ja supramolekyylisessä. Sappihappo- ja aminohappokonjugaatteja on tutkittu myös ionikuljettimina, reseptoreina ja gelaattoreina. Lisäksi suurta mielenkiintoa on herättänyt konjugaattien käyttö farmakologisissa sovelluksissa, joissa niitä käytetään mm. lääkeaineiden kuljetuksessa ja aihiolääkkeissä. Edellä mainittujen käyttötarkoitusten lisäksi sappihappo-aminohappokonjugaatteja on käytetty kultananopartikkelien valmistuksessa sekä reaktion enantioselektiivisyyttä edesauttavina katalyyteinä.

Tutkielman kokeellisen osion tarkoituksena oli valmistaa sappihappojen aminoetyyliamidien ja L-proliinin konjugaatteja sekä tutkia niiden geelinmuodostusominaisuuksia eri liuottimissa. Sappihaposta valmistettiin ensin sappihapon metyyliesteri, johon konjugoitiin etyleenidiamiini amidisidoksella. Näin saatuun sappihapon 2-aminoetyyliamidiin liitettiin Boc-suojattu proliini. Erikoistyön lopussa valmistetuista tuotteista poistettiin Boc-suojaus.

ESIPUHE

Tämä tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla lukuvuoden 2011–2012 aikana. Työn kokeellinen osa tehtiin kesällä 2011.

Kirjallisen osan lähdemateriaali on etsitty käyttäen SciFinder Scholar -tietokantaa ja eri kustantajien verkkojulkaisuja sekä painettuja teoksia. Hakusanoina on käytetty mm. *bile acid conjugates*, *bile acid-amino acid conjugates*, *bile acid-peptide conjugates*, *amino acid derivative(s)*, *oligopeptide derivative(s)* ja *gelation* sekä *supramolecular chemistry*. Hauissa pyrittiin keskittymään mahdollisimman tuoreisiin, vuosina 2000–2012 julkaistuihin artikkeleihin, mutta mukana on muutama vanhempikin artikkeli.

Teoriaosuudessa on hyödynnetty myös Jyväskylän yliopiston 19. ja 20. kansainvälisen kesäkoulun luentoja (CH1: *Organo- and hydrogelators and their applications* ja CH2: *Medicinal Chemistry*).

Tutkielmani ohjaajana ja erikoistyöni valvojana toimi akatemiatutkija, dosentti Elina Sievänen, jota haluan kiittää mielenkiintoisesta ja haastavasta tutkimusaiheesta sekä mahdollisuudesta työskennellä hänen tutkimusryhmässään. Haluan kiittää myös erikoistyöni ja tutkielmani toisena ohjaajana toiminutta tohtorikoulutettava Virpi Noposta hyvästä ja kärsivällisestä opastuksesta ja hyvistä neuvoista käytännön työn aikana. Osoitan kiitokseni myös erikoislaboratoriomestari Esa Haapaniemelle NMR-spektrien mittaamisesta sekä laboratoriomestari Elina Hautakankaalle alkuaineanalyysien tekemisestä.

Lämpimät kiitokset kuuluvat Pekalle, perheelleni sekä ystäväilleni, jotka ovat jaksaneet kannustaa minua opintojeni aikana.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	I
ESIPUHE	II
SISÄLLYSLUETTELO.....	III
LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT	VI

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO	1
2 SAPPIHAPOT	2
3 AMINOHAPOT JA OLIGOPEPTIDIT.....	5
4 SAPPIHAPPO-AMINOHAPPOKONJUGAATIT.....	7
4.1 Sappihappo-aminohappokonjugaatit molekyylisateenvarjoina.....	7
4.2 Sappihappo-aminohappokonjugaatit reseptoreina.....	13
4.2.1 Asykliset reseptorit.....	14
4.2.2 Sykliset reseptorit	17
4.3 Sappihappo-aminohappokonjugaatit gelaattoreina.....	18
4.4 Sappihappo-aminohappokonjugaatit farmakologisissa sovelluksissa	23
4.4.1 Sappihappo-aminohappokonjugaatit viruslääkkeinä.....	25
4.4.2 Sappihappo-aminohappokonjugaatit aihiolääkkeissä.....	28
4.4.3 Sappihappo-aminohappokonjugaatit kemoterapiassa.....	33
4.4.4 Sappihappo-aminohappokonjugaatit muissa farmakologisissa sovelluksissa	35
4.5 Sappihappo-aminohappokonjugaatit muissa sovelluksissa	36
5 SAPPIHAPPOJEN OLIGOPEPTIDIKONJUGAATIT	40
5.1 Sappihappojen oligopeptidikonjugaatit farmakologisissa sovelluksissa	40
5.2 Sappihappojen oligopeptidikonjugaatit supramolekyylisessä.....	48
6 YHTEENVETO	50

KOKEELLINEN OSA

7 TYÖN TARKOITUS	53
8 MENETELMÄT, LAITTEET JA KÄYTETYT REAGENSsit	55
8.1 Menetelmät ja laitteet	55
8.2 Käytetyt reagenssit, niiden puhtaus sekä valmistajat	56
9 SYNTEESIT PÄÄPIIRTEITTÄIN	59
9.1 Yleisohje sappihapon metyyliesterien valmistukseen (122, 123, 124, 125)	59
9.2 Yleisohje sappihapon 2-aminoetyyliamidien valmistukseen (126, 127, 128, 129)..	60
9.3 Yleisohje L-Boc-proliinin konjugointiin (130, 131, 132, 133)	61
9.4 Yleisohje Boc-suojauksen poistoon (134)	61
10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	62
10.1 Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (122)	62
10.2 Metyyli-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (123)	62
10.3 Metyyli-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (124)	63
10.4 Metyyli-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (125)	63
10.5 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (126)	63
10.6 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (127)	64
10.7 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (128)	64
10.8 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (129)	65
10.9 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarbonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α -hydroksi-5 β - kolan-24-amidi (130)	65
10.10 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarbonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β - kolan-24-amidi (131)	66
10.11 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarbonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β - kolan-24-amidi (132)	67
10.12 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarbonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi- 5 β -kolan-24-amidi (133)	68

10.13 Boc-suojauksen poistaminen	69
11 GEELINMUODOSTUSKOKEET	69
12 SYNTEESIOHJEET	72
12.1 Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (122)	72
12.2 Metyyli-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (123)	72
12.3 Metyyli-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (124)	72
12.4 Metyyli-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (125)	72
12.5 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (126)	73
12.6 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (127)	73
12.7 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (128)	74
12.8 <i>N</i> -(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (129)	74
12.9 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarboxyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (130)	75
12.10 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarboxyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (131)	75
12.11 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarboxyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (132)	76
12.12 <i>N</i> -{ <i>N'</i> -[<i>N''</i> -(<i>tert</i> -Butoksikarboxyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (133)	77
12.13 <i>N</i> -[(<i>N'</i> -L-Prolinamidi)etyyli]-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (134)	77
13 VALMISTETUT TUOTTEET	79
14 YHTEENVETO	80
15 KIRJALLISUUSLUETTELO	81
LIITTEET	87

LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT

Ala	alaniini
Apical	apikaalinen, kärjessä sijaitseva
Arg	arginiini
ASBT	Apical Sodium-dependent B ile salt T ransporter, apikaalinen natrium-riippuvainen sappisuolujen kuljettaja
Asn	asparagiini
Asp	asparagiinihappo
Basolateral	basolateraalinen, epiteelin tyvikalvossa kiinni olevan solun tyviosan puoleinen
Boc	<i>tert</i> -butyylioksikarbamaatti-suojausryhmä
CA	koolihappo
CaCo-2	human colon adenocarcinoma cells, ihmisen paksusuolen syövästä eristetty solulinja
Canalicular	kanalikulaarinen kudos; kudos, jossa on tiehyitä
Cbz	amiinien suojauksessa käytetty karbamaattisuojaus
CDCA	kenodeoksikoolihappo
DCA	deoksikoolihappo
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer, häiriötön vahvistaminen polarisaation siirrolla
Enterosyytti	ohutsuolen lieriöepiteelin solu
ESI	E lectrospray I onization, sähkösumutus-ionisaatio
Fmoc	Amiinien suojauksessa käytetty fluorenyylimetyylioksikarbamaatti-suojausryhmä
GABA	G amma- a minobutyric acid, Gamma-aminovoihappo, tärkein aivojen ja muun keskushermoston hermosolujen toimintaa hidastava välittäjäaine
Gln	glutamiini
Glu	glutamiinihappo
Gly	glysiini
HeLa-solut	Henrietta Lacksin kohdunkaulansyövästä eristetty vanhin yhtenäinen tutkimuskäytössä oleva solulinja
Hepatosyytti	maksasolu
His	histidiini

HMBC	H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation, erityyppisten ytimien kemiallisten siirtymien korrelaatio useamman sidoksen yli
HMQC	H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence, näyttää protonien ja hiilten väliset korrelaatiot
HSV	H erpes S implex -virus
Ile	isoleusiini
In vitro	koeputkessa tehty tutkimus
In vivo	elävässä organismissa tehty tutkimus
LCA	litokoolihappo
Leu	leusiini
Lys	lysiini
m/z	massa/varaus-suhde
MeCA	metyylikolaatti
MeCDCA	metyylikendeoksikolaatti
MeDCA	metyylideoksikolaatti
MeLCA	metyylilitokolaatti
MeOH	metanoli
Met	metioniini
NMR	N uclear M agnetic R esonance, ydinmagneettinen resonanssi
NTCP	S odium- T aurocholate C otransporting P olypeptide, natriumin ja taurokolaatin yhteiskuljettajapolypeptidi
OATP	O rganic A nion T ransporter P rotein, orgaanisten anionien kuljettajaproteiini
PFG	P ulsed F ield G radient, NMR -spektroskopiassa käytetty mittaustekniikka
Phe	fenyylialaniini
ppm	parts per million, 1/1 000 000
Pro	proliini
Refl.	refluksointi
rt	room temperature, huoneenlämpö
SEM	S canning E lectron M icroscope, pyyhkäiselektronimikroskopia
Ser	seriini

TEM	T ransmission E lectron M icroscope, transmissio- eli läpäisy- elektronimikroskopia
TFA	trifluoretikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
Thr	treoniini
TLC	T hin L ayer C hromatography, ohutlevykromatografia
TOF	T ime o f F light, lentoaika-analysaattori
Trp	tryptofaani
Tyr	tyrosiini
Val	valiini

1 JOHDANTO

Tässä tutkielmassa perehdytään sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatteihin, niiden synteettiseen valmistukseen sekä yhdisteiden kemiallisiin ja biologisiin ominaisuuksiin. Lisäksi tarkastellaan niiden erilaisia käyttömahdollisuuksia.

Elimistössä sappihapot esiintyvät pääosin glysiini- ja tauriinikonjugaatteina. Tämän vuoksi niiden aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatit ovatkin olleet laajan kiinnostuksen ja tutkimuksen kohteina useiden vuosikymmenten ajan. Niillä on rakenteensa vuoksi useita mielenkiintoisia sovellusmahdollisuuksia mm. materiaalikemian ja rakennekemian saralla. Myös kliiniset sovellukset ovat lähes rajattomat: sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatteja tutkitaankin potentiaalisina materiaaleina lääkeaineiden kuljetuksessa, aihiolääkesyntetiikassa ja geeniterapiassa.

Sappihappojen aminohappokonjugaatteja käytetään rakenneosina niiden monipuolisten ominaisuuksien vuoksi. Sappihappo-aminohappokonjugaateista valmistetut makrosykliset rakenteet voivat toimia rakenneosina lääkekehityksessä, materiaalikemiassa ja supramolekyylikemiassa. Molekyyliateenvarjoina käytettäviä sappihappo-aminohappokonjugaatteja kehiteltiin alkujaan paitsi tehostamaan hydrofiilisen lääkeaineen kuljetusta hydrofobisten kalvojen läpi, myös parantamaan lääkeaineen vesiliukoisuutta ja tiettyjen hydrofobisten lääkeaineiden hydrolyyttistä kestävyyttä. Muita tutkittuja käyttötarkoituksia sappihappo-aminohappoanalogeille ovat toimiminen mm. ionikuljettimina, reseptoreina ja gelaattoreina.

Peptidi- ja oligopeptidipohjaisten lääkkeiden ongelmana ovat ruoansulatuskanavassa toimivat peptidaasit, jotka aikaansaavat lääkkeiden pilkkoontumisen. Lisäksi peptidilääkkeet kulkeutuvat heikosti solukalvon läpi. Useissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että peptidien konjugoiminen johonkin kantajamolekyyliin, esimerkiksi sappihappoon, saattaa kasvattaa niiden pysyvyyttä tai parantaa niiden kulkeutumista solukalvon läpi. Kun kantajamolekyylinä toimii sappihappo, avustaa sappihappojen kuljetusmekanismi konjugaatin kuljetuksessa. Sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidijohdannaisten farmakologisia sovelluksia löytyy niin aihiolääkkeistä, virus- ja mikrobi-

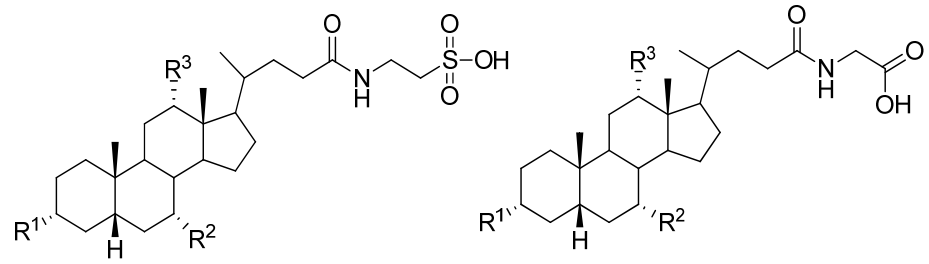
lääkkeistä kuin syöpälääkkeistäkin. Lisäksi oligopeptidikonjugaatteja tutkitaan rakennesina kehiteltäessä rokotteita.

2 SAPPIHAPOT

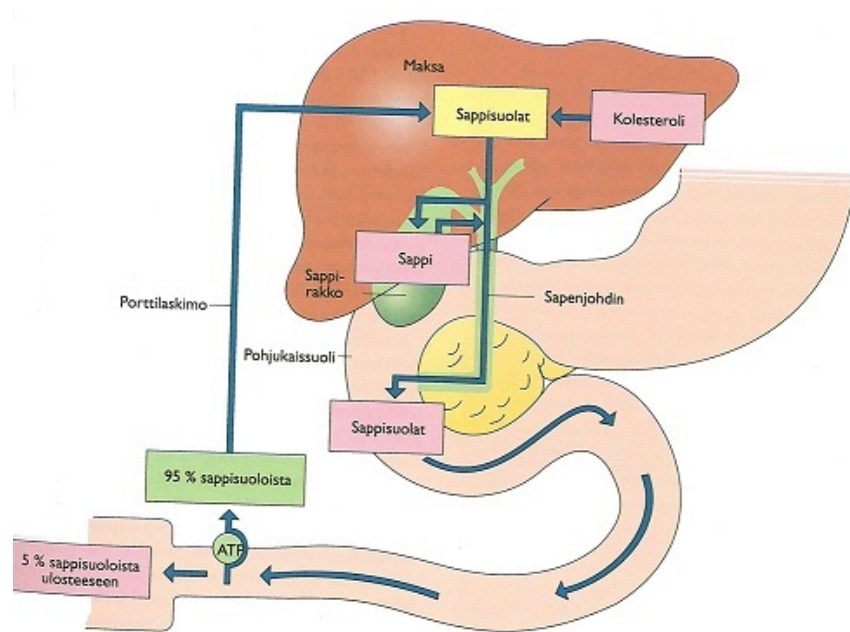
Sappihapot kuuluvat laajaan steroidien perheeseen. Sappihapot eristettiin sapesta 1900-luvun alussa ja niiden rakennetta yritettiin havainnollistaa Wielandin ja hänen tutkimusryhmänsä toimesta jo vuonna 1912.¹ Tuolloin esitetty sappihapon rakenne osoittautui kuitenkin virheelliseksi. Tästä huolimatta Heinrich Wieland sai Nobelin kemian palkinnon vuonna 1927 sappihappojen rakenteen selvittämiseen tähtäävistä tutkimuksistaan (*”for his investigations of the constitution of bile acids and related substances”*).²

Nykyaikainen sappihappojen tutkimus alkoi 1950-luvulla.³ Sappihappojen eristäminen ja karakterisointi sekä niiden metabolian ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien tutkiminen ovat antaneet runsaasti tietoa sappihappojen roolista mm. fysiologian ja farmakologian aloilla. Alussa sappihappoja pidettiin vain detergentteinä, mutta myöhemmin tutkijat totesivat niiden konjugaattien osallistuvan myös rasvojen ja rasvaliukoisten yhdisteiden aineenvaihduntaan. Tutkimusmenetelmien kehittyessä on havaittu sappihappojen näyttölevän tärkeää roolia solutason säätelymekanismeissa, kuten farnesoidi X -reseptorin, pregnaani X -reseptorin sekä D-vitamiinin reseptorin ligandeina.³

Sappihapot ovat steroidirunkoisia maksassa entsyymaattisesti muodostuvia kolesterolin aineenvaihduntatuotteita.^{4,5} Sappihapot esiintyvät yleensä vesiliukoisina glysiini- tai tauriini-konjugaatteina (kuva 1), jollaisina ne varastoituvat sappirakkoon. Sappi eritetään sappirakosta ruokailun yhteydessä ohutsuoleen, jossa sappihapot osallistuvat ravintoainneiden, lähinnä rasvojen, ruoansulatukseen. Sappihapot emulgoivat ruoan rasvat miselleiksi, jolloin rasvan pinta-ala kasvaa ja ne voidaan hajottaa lipaasientsyymien avulla. Sappihapot imeytyvät takaisin ohutsuolesta sekä aktiivisen että passiivisen mekanismin avulla, ja palaavat porttilaskimon kautta maksaan. Siellä ne puhdistetaan ja palautetaan takaisin sappirakkoon. Tätä kierrätysmekanismia kutsutaan *enterohepaattiseksi kierrokseksi* (kuva 2), ja se toistuu 6–15 kertaa vuorokaudessa.⁴

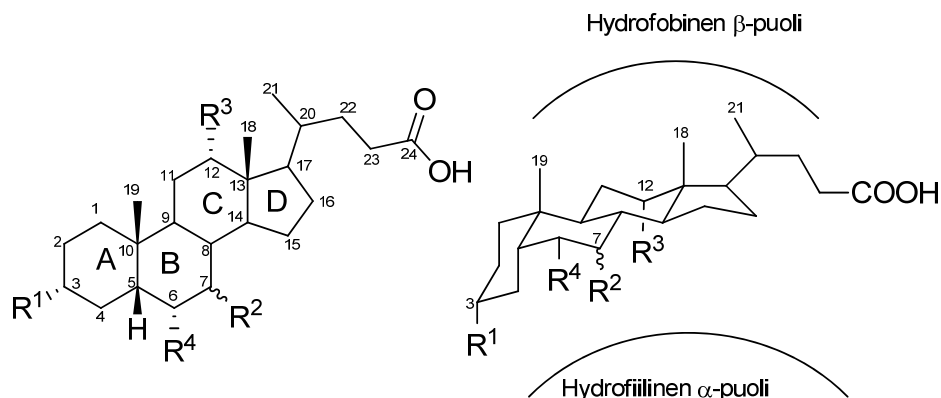


Kuva 1. Sappihappojen tauriini- ja glysiinikonjugaatit.



Kuva 2. Enterohepaattinen kierto.⁶

Sappihappojen rakenne koostuu kolmesta kuusirenkaasta ja yhdestä viisirenkaasta, joita merkitään kirjaimilla A–D, sekä lyhyestä alifaattisesta sivuketjusta. Jäykässä ja kove-
rassa steroidirungossa A- ja B-renkaat ovat *cis*-asemassa toisiinsa nähden. Sappihapot
ovat amfiifilisiä, eli niillä on sekä hydrofobinen että hydrofiilinen puoli (kuva 3).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Litokoolihappo LCA, 1	OH	H	H	H
Ursodeoksikoolihappo UDCA, 2	OH	β-OH	H	H
Kenodeoksikoolihappo CDCA, 3	OH	α-OH	H	H
Deoksikoolihappo DCA, 4	OH	H	OH	H
Koolihappo CA, 5	OH	α-OH	OH	H
Hyodeoksikoolihappo HDCA, 6	OH	H	H	OH
Hyokoolihappo HCA, 7	OH	α-OH	H	OH

Kuva 3. Yleisimpien sappihappojen rakenteet ja steroidirungon numerointi.

Sappihappojen hydroksyyli- ja happoryhmät tekevät niistä monipuolisesti muokattavan molekyylin. Steroidirungon hydroksyyli-ryhmiä voidaan esteröidä, hapettaa, eetteröidä, pelkistää tai muuttaa aminoryhmiksi. Sivuketjun 24-asemassa oleva happoryhmä voidaan puolestaan esimerkiksi esteröidä, amidoida tai muuttaa anhydridiksi. Lisäksi sappihapot ovat bioyhenteensopivia ja pysyviä, sekä kykenevät itsejärjestäytymiseen. Nämä ominaisuudet avaavat lukuisia mahdollisuuksia synteesinsuunnitteluun.⁴

Sappihapot jaotellaan primäärisiin ja sekundäärisiin sappihappoihin.⁴ Primäärisiä, maksassa biosyntetisoituja sappihappoja ovat kenodeoksikoolihappo (3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo) ja koolihappo (3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolaani-24-happo). Näistä suolistobakteerien toiminnan avulla muodostuvat sekundääriset sappihapot litokoolihappo (3 α -hydroksi-5 β -kolaani-24-happo) ja deoksikoolihappo (3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo). Näiden lisäksi farmakologisissa sovelluksissa käytetään synteettistä ursodeoksikoolihappoa (3 α ,7 β -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo), hyodeoksikoolihappoa

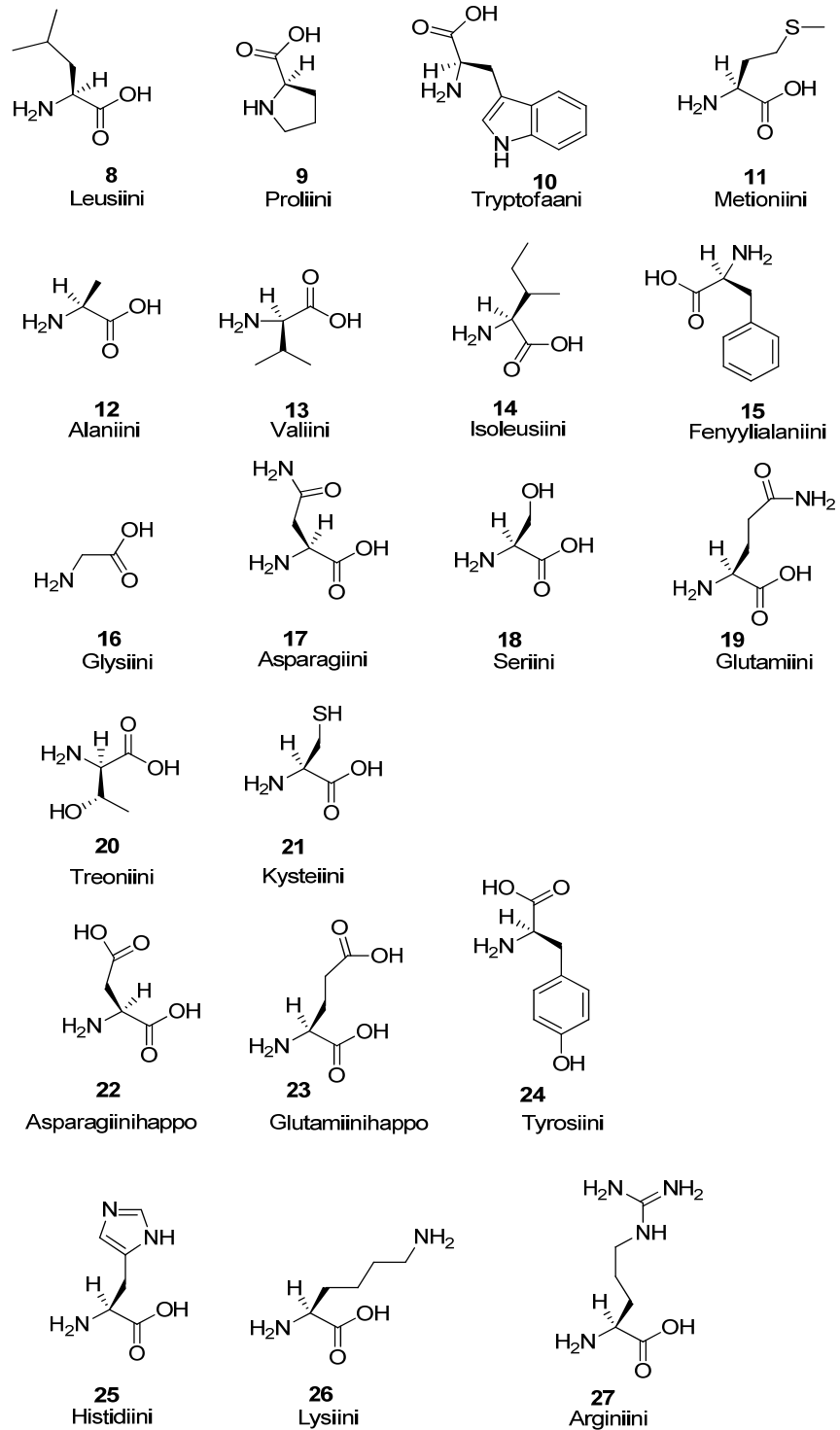
(3 α ,6 α -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo) sekä hyokoolihappoa (3 α ,6 α ,7 α -trihydroksi-5 β -kolaani-24-happo). Luonnossa ursodeoksikoolihappoa esiintyy vain karhun sapessa. Hyodeoksikoolihappoa ja hyokoolihappoa puolestaan löytyy sian sapesta.¹

3 AMINOHAPOT JA OLIGOPEPTIDIT

Aminohapot ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa on sekä amino- (-NH₂) että karboksyylihapporyhmä (-COOH) liittyneenä samaan molekyyliin.^{7,8} Aminoryhmän viereiseen α -hiileen on liittynyt sivuketju, jota merkitään yleisesti kirjaimella R. Sivuketjun rakenne vaihtelee eri aminohapoilla. Aminohappojen rakenteet on esitetty kuvassa 4, ja ne voidaan luokitella positiivisesti tai negatiivisesti varautuneiksi, tai neutraaleiksi sivuketjun rakenteen mukaan. Tämän lisäksi sivuketju voi olla poolinen tai pooliton. Aminohapot esiintyvät fysiologisessa pH:ssa (pH 7,4) kahtaisioneina (*zwitterion*), jolloin karboksyylihapporyhmä on negatiivisesti varautunut ja aminoryhmällä on positiivinen varaus. Yksinkertaisinta eli glysiiniä (Gly) lukuun ottamatta aminohapoilla tavataan optista isomeriaa, mikä aiheuttaa lisävaatimuksia niiden laboratoriosynteeseille. Eliöissä tavaataan pääasiassa L-muodon aminohappoja.⁹

Aminohapot voivat polymeroitua peptideiksi, jolloin vähintään kaksi aminohappoa muodostaa peptidisidoksen kondensaatioreaktiolla.⁹ Oligopeptideiksi kutsutaan aminohappoketjua, jossa on 2–12 aminohappoa liittyneenä toisiinsa.¹⁰ Polypeptidit puolestaan ovat aminohappoketjuja, joissa on yli 15 aminohappoa.

Proteiinit ovat muodostuneet jopa tuhansista toisiinsa liittyneistä aminohapoista. Ne toimivat esimerkiksi entsyymeinä (trypsiini, polymeraasit), rakenneaineina (keratiini, aktiini, myoglobiini), kuljetusproteiineina (hemoglobiini), puolustusproteiineina (immunoglobuliinit) sekä varastoproteiineina (ferritiini).¹¹



Kuva 4. Elimistössä luonnollisesti esiintyvien aminohappojen rakenteet.¹²

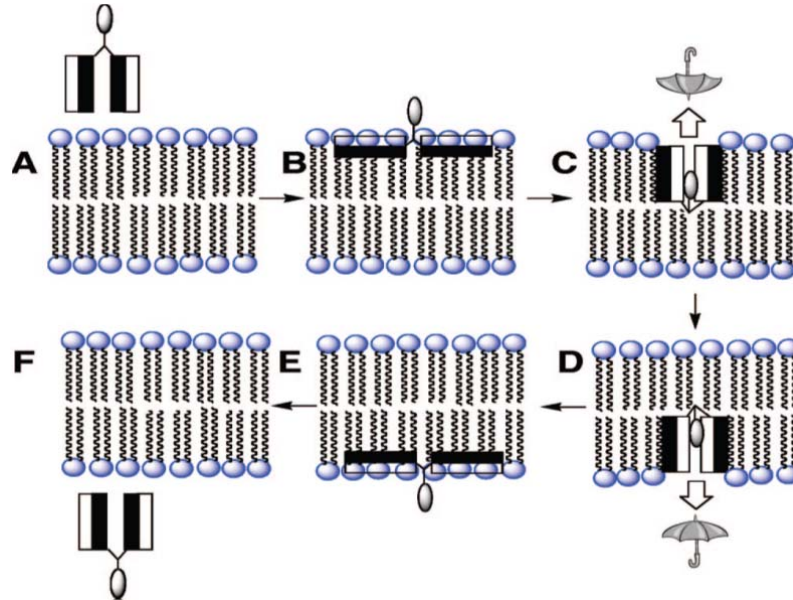
4 SAPPIHAPPO-AMINOHAPPOKONJUGAATIT

Koska sappihapot konjugoituvat elimistössä glysiiniin ja tauriiniin, niiden aminohappokonjugaatteja on tutkittu pitkään. Ensimmäinen raportti sappihappojen glysiini- ja tauriini-konjugaattien synteettisestä valmistuksesta on vuodelta 1906.¹³ Tuolloin konjugaatteja valmistettiin mm. esteröimällä ja amidoimalla.^{1,14} Synteesimenetelmien kehitys on mahdollistanut konjugaattien valmistamisen mm. seka-anhydridimenetelmää käyttäen. Sappihappojen funktionaaliset happo- ja hydroksyyli-ryhmät sekä aminohappojen happo- ja aminoryhmät tarjoavat lukuisia mahdollisuuksia synteesinsuunnittelussa. Koska sappihapot ovat amfifiilisiä, kiraalisia ja kestäviä, konjugaateilla on käyttöä mm. molekyyli-tunnistuksessa, kationin/anioninsitojina sekä biologisesti tärkeiden molekyylien, kuten sokereiden ja aminohappojen, sitoijina.¹⁵

Tässä kappaleessa esitellään tuoreimpia esimerkkejä sappihappo-aminohappokonjugaattien sovelluksista supramolekyylikemian ja farmakologian alueilla.

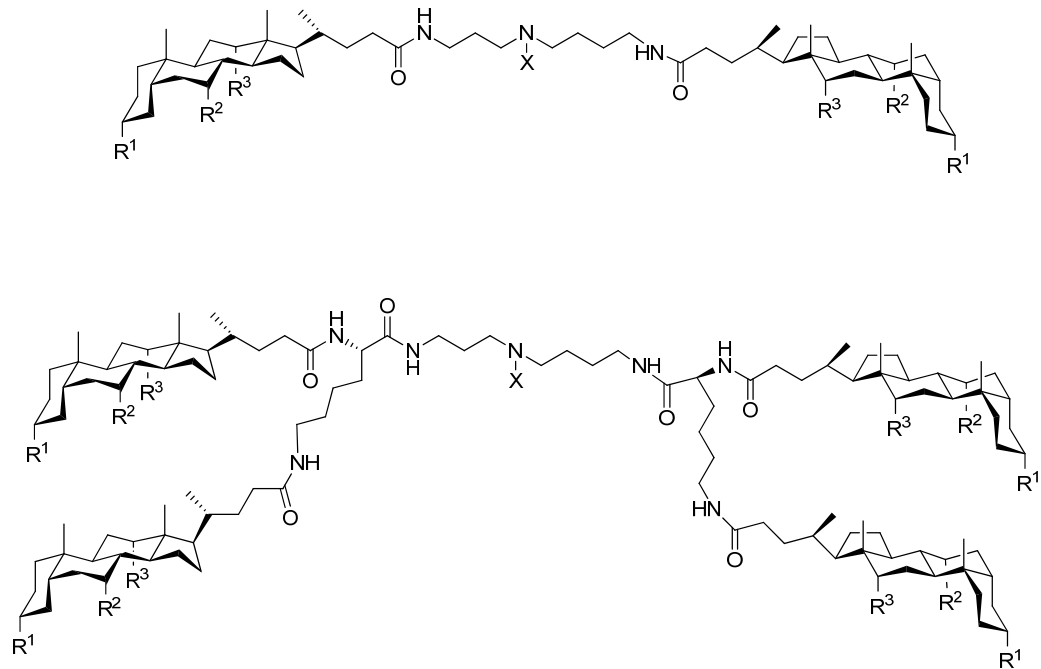
4.1 Sappihappo-aminohappokonjugaatit molekyyli-sateenvarjoina

Molekyyli-sateenvarjot ovat yhdisteitä, joissa vähintään kaksi amfifiilistä rakenneosaa on sitoutunut kovalenttisesti keskusrakenteeseen. Molekyyli-sateenvarjot kehiteltiin alkuun paitsi tehostamaan hydrofiilisen lääkeaineen kuljetusta hydrofobisten kalvojen läpi, myös parantamaan lääkeaineen vesiliukoisuutta ja tiettyjen hydrofobisten lääkeaineiden hydrolyyttistä kestävyyttä. Molekyyli-sateenvarjon tarkoituksena on suojata siihen kiinnittynyttä molekyyliä hydrofobiselta ympäristöltä sen kulkiessa (solu)kalvon läpi. Kuvassa 5 esitetään hypoteettinen mekanismi molekyyli-sateenvarjon toiminnasta.

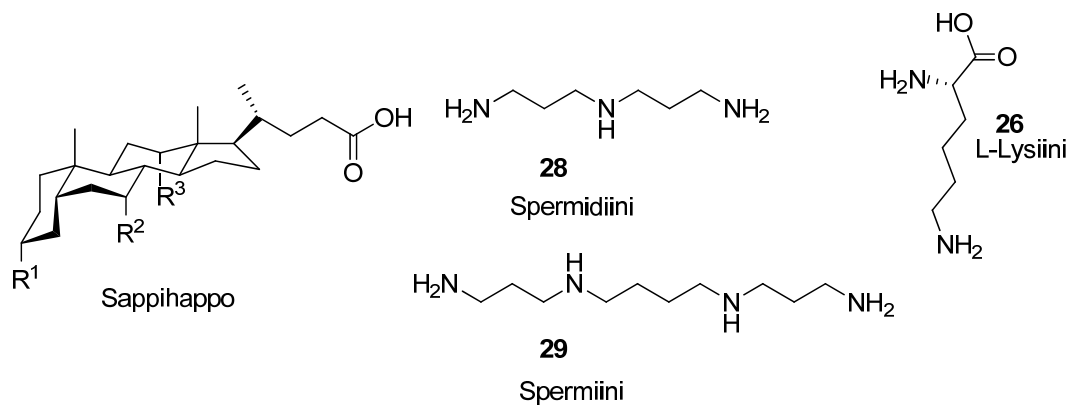


Kuva 5. Hypoteettinen mekanismi molekyyლისateenvarjon toiminnasta.¹⁶

Sappihapoista johdetut molekyyლისateenvarjot luokitellaan kaksi- tai neliseinäisiksi (kuva 6). Niiden valmistuksessa on sappihapon lisäksi käytetty esimerkiksi erilaisia polyamiineja, kuten spermidiiniä ja spermiiniä, sekä aminohappo L-lyysiiniä.¹⁷ Sekä Regen että Janout *et al.*¹⁶⁻¹⁹ ovat tutkineet molekyyლისateenvarjoja, jotka ovat rakentuneet deoksikoolihaposta, spermiinistä, spermidiinistä ja lyysiinistä. Nämä rakenneosat esitetään kuvassa 7.

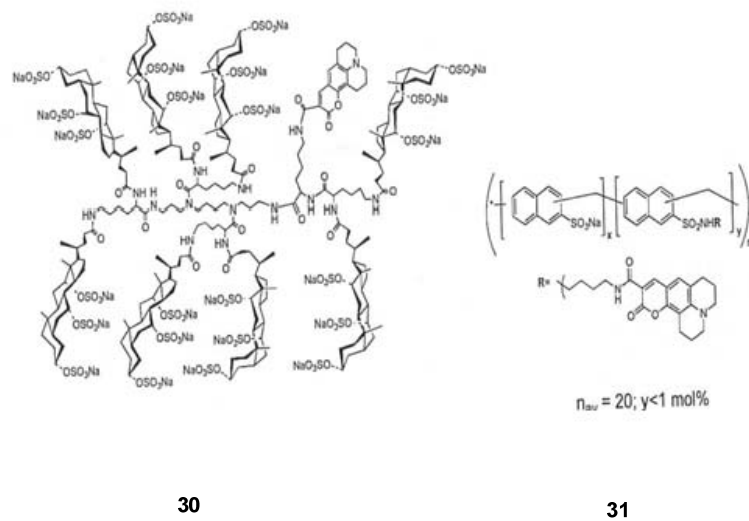


Kuva 6. Esimerkki sappihapoista johdetun kaksi- (ylhällä) ja neliseinäisen (alhaalla) molekyyლისateenvarjon rakenteesta.^{16,17}



Kuva 7. Esimerkki sappihapoista johdetun molekyyლისateenvarjon rakenneosista.¹⁶

Regen *et al.* ovat valmistaneet ja tutkineet fluoresoivalla leimalla varustettuja koolihiaposta ja lysiinistä valmistettuja persulfidoituja molekyyლისateenvarjoja.¹⁹ Tutkimuksissa haluttiin selvittää, kykeneekö em. molekyyლისateenvarjo läpäisemään sekä liposomikalvon että solukalvon. Myös passiivisen diffuusion merkitystä soluun kuljetuksessa tutkittiin. Kuljetusominaisuuksia vertailtiin molekyyლისateenvarjon sekä vastaavan koon ja varauksen omaavan ei-molekyyლისateenvarjo-analogin välillä (kuva 8).



Kuva 8. Persulfidoitu sappihappo-lysiinimolekyyლისateenvarjo (**30**) ja vertailumolekyyli (**31**).¹⁹

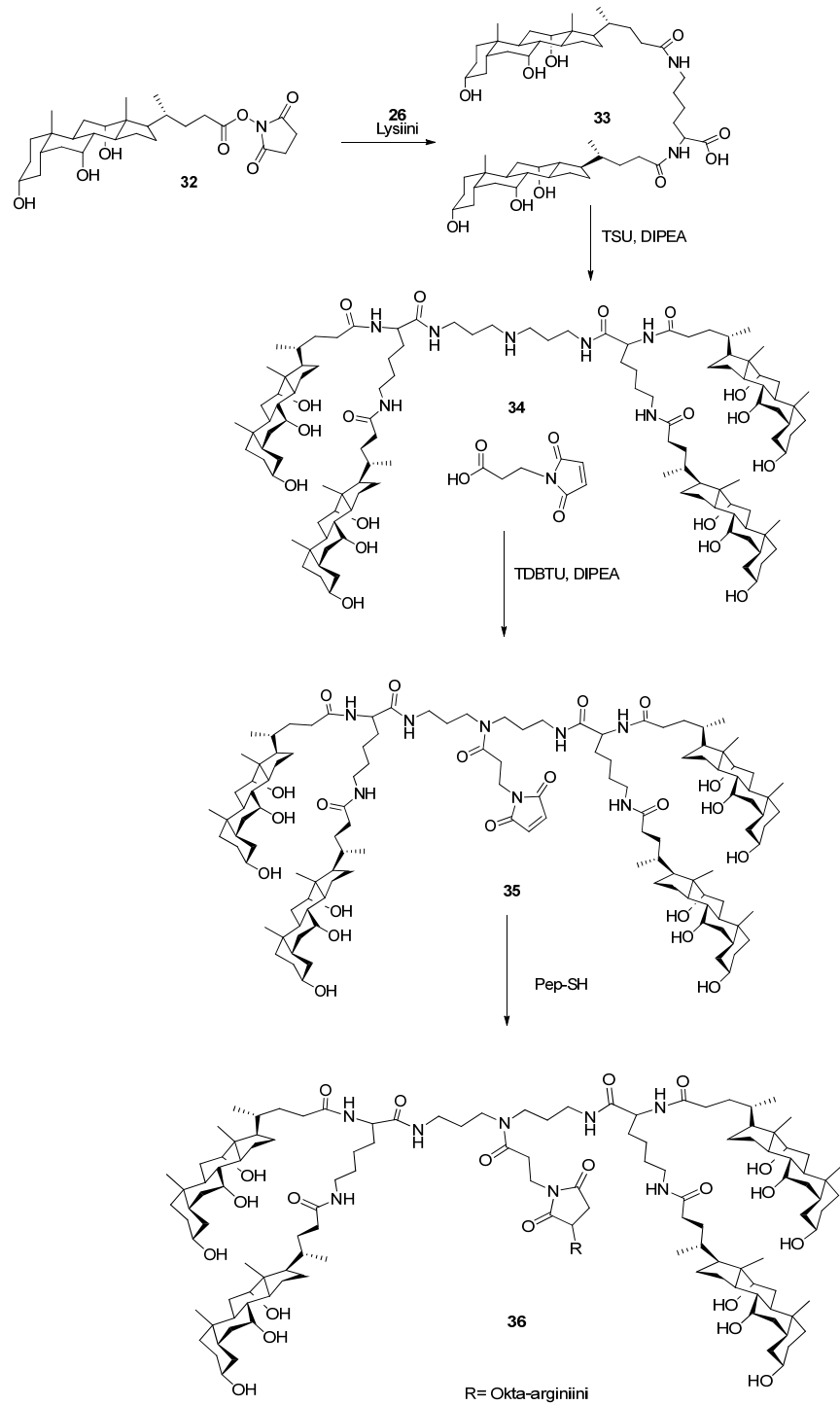
Fluoresoivalla leimalla varustettujen molekyylien kulkeutumisesta HeLa-soluihin tutkittiin konfokaalimikroskoopilla. Yli 20 erillisessä kokeessa havaittiin, että persulfidoidut molekyyლისateenvarjot (**30**) kulkeutuivat joka kokeessa HeLa-soluihin, kun verrokkimolekyyllillä (**31**) kulkeutuminen vaihteli. Näistä tutkimustuloksista voitiin päätellä, että anioninen molekyyლისateenvarjo kykeni läpäisemään solukalvon. Myös passiivisen diffuusion rooli korostui solukalvon läpäisyssä. Tämän vuoksi molekyyლისateenvarjo-lääkeainekonjugaatteja voidaan mahdollisesti käyttää lääkeaineen kohdistamisessa tummaan. Lisäksi Regen *et al.* havaitsivat vastaavien persulfidoitujen sappihappo-lysiinikonjugaatista muodostuneiden molekyyლისateenvarjojen osoittavan anti-HIV- ja anti-HSV-aktiivisuutta.¹⁷

Pienten RNA (siRNA) -molekyylien kykyä häiritä ja vaimentaa geeniekspressiota on tutkittu mahdollisuutena kehittää uusia kemoterapeuttisia lääkeaineita ja biologisia työkaluja. Tavoitteena on ollut tehostaa siRNA:n kulkeutumista suoraan sytosoliin. Tällöin

siRNA-molekyylit voisivat liittyä tehokkaasti RNA-indusoituun vaimennuskompleksiin (RISC) vähentäen geeniekspressiota.¹⁸

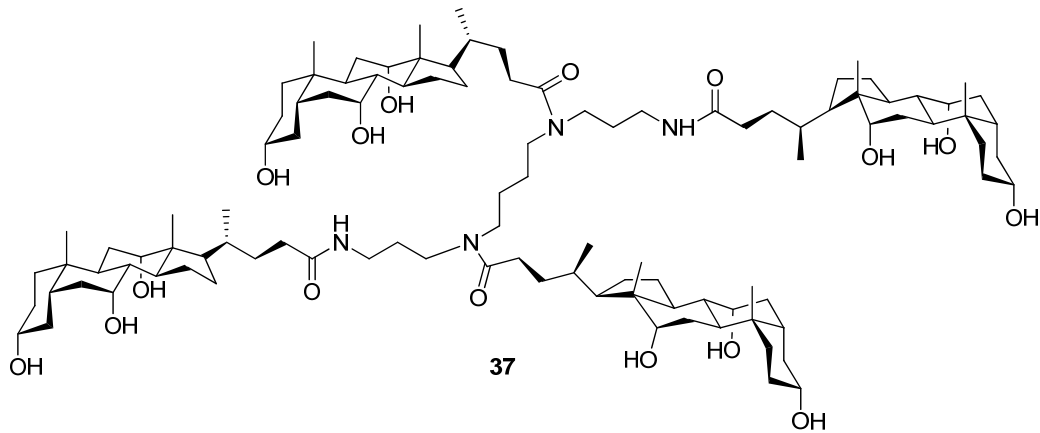
Endosomaalisen reitin tiedetään olevan tehoton, minkä vuoksi tehokkaampia kuljetusmekanismeja tarvitaan. Kehitelläkseen siRNA-kuljetukselle korvaavan mekanismin yleisesti käytössä olevan endosytoosireitin sijaan, Regen *et al.* valmistivat koolihapon sukkinimidiesteristä (**32**) ja lysiinistä (**26**) molekyylisateenvarjoja, joihin oli konjugoitu okta-arginiini (kuva 9). Okta-arginiini valittiin molekyylisateenvarjon osaksi, koska sen vierekkäiset positiiviset varaukset sitovat siRNA:a elektrostaattisin vuorovaikutuksin ja vetysidoksin. Kontrollimolekyylinä tutkimusryhmä käytti okta-arginiinianalogia, jossa molekyylisateenvarjo oli korvattu 2-merkaptetanolilla. Tutkimusryhmän oletuksena oli, että molekyylisateenvarjo tarjoaisi kulkuväylän siRNA:lle ja samalla suojaisi sitä molekyylin läpäistessä kaksoiskalvon.

Ryhmän tutkimuksista kävi ilmi, että molekyylisateenvarjo-okta-arginiinikonjugaatti (**36**) edisti siRNA:n kulkeutumista HeLa-soluihin. Tämä voitiin todeta eGFP:n (*enhanced green fluorescent protein*) ilmenemisen (ekspression) vaimenemisesta. Vaimenemisen havaittiin tehostuvan, kun molekyylisateenvarjon seinien lukumäärää lisättiin. Myös rakenteessa olevan disulfidisillan korvaaminen maleimidoryhmällä tehosti geeniekspression vaimenemista. Tuloksia verrattiin kaupalliseen Lipofectamine2000-transfektioaineeseen. Tulokset osoittautuivat samankaltaisiksi molekyylisateenvarjo-okta-arginiinikonjugaatin ollessa kuitenkin vähemmän sytotoksinen.¹⁸



Kuva 9. Koolihapon sukkinimidiesteristä ja lysiinistä valmistettu molekyylisateenvarjo, johon on konjugoituneena okta-arginiini.¹⁸

Koolihaposta ja lysiinistä valmistettujen molekyyლისateenvarjoanalogien (**37**, kuva 10) käyttöä ionikuljettimina on tutkittu. Na⁺-ionien kulkeutumisenopeutta soluun seurattiin ²³Na NMR-spektroskopiolla. Tutkimuksissa todettiin, että valmistetut konjugaatit osoittivat merkittävää aktiivisuutta Na⁺-ionien kuljettamisessa fosfolipidikalvon läpi soluun. Tätä ominaisuutta tutkitaan jatkossa lääkeainekehittelyn näkökulmasta, sillä korkean aktiivisuuden ja selektiivisyyden omaavat ionikuljettimet ovat käyttökelpoisia mm. antibiootteina. Mikäli ionikuljetin kykenisi selektiivisesti tunnistamaan ja tuhoamaan mikro-organismeja, voitaisiin välttää jopa lääkeaineresistenssin syntyminen.²⁰



Kuva 10. Koolihaposta ja lysiinistä valmistettu molekyyლისateenvarjoanalogi (**37**), joka voi toimia ionikuljettimena.²⁰

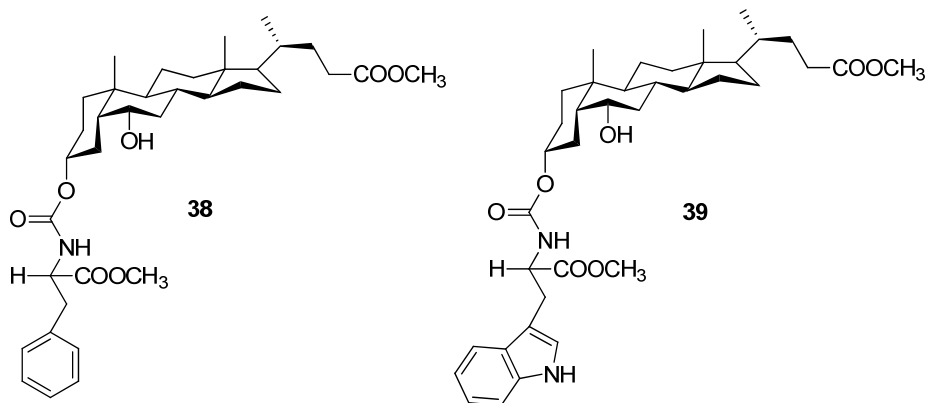
4.2 Sappihappo-aminohappokonjugaatit reseptoreina

Keinotekkoisten reseptorien suunnittelu, valmistaminen ja rakenneanalyysi on tärkeä bioorganisen kemian osa-alue. Reseptori on solun erikoistunut proteiinimolekyyli, joka aktivoituessaan käynnistää siihen kytkeytyvät solun fysiologiset signaalinvälitysmekanismit. Reseptoreita aktivoivat elimistön omat viestimolekyyliet kuten hormonit, hermoston välittäjäaineet, kasvutekijät ja sytokiinit.²¹ Useimmat lääkeaineet vaikuttavat elimistössä sitoutumalla em. viestimolekyylien reseptoreihin joko agonisteina aktivoiden niitä

tai antagonisteina estäen niiden aktivoitumista. Reseptoriin sitoutuvia aineita kutsutaan ligandeiksi. Ensimmäisen kerran reseptoreista puhui Paul Erlich 1900-luvun alussa. Tällöin hän esitti, että yhdisteet ovat inaktiivisia, elleivät ne kiinnity tietyihin kohdeorganismeihin. Reseptoreita voidaan käyttää mm. enantioselektiivisinä tunnistimina tai molekyylin kuljettimina.²²

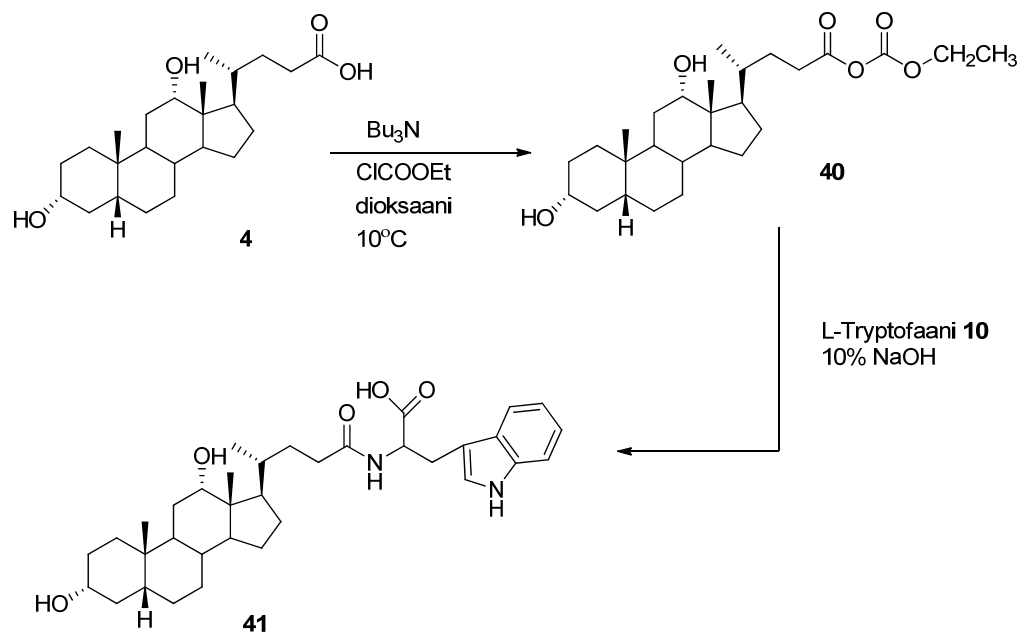
4.2.1 Asykliset reseptorit

Molekyyliatulat ovat esimerkki asyklisistä reseptoreista. Ne tarjoavat mikroympäristön substraatille molekyyliateenvarjon tapaan. Wang *et al.* ovat valmistaneet molekyyliatulyyppisiä rakenteita hyodeoksikoolihaposta ja sekä L- että D-aminohappojen metyyliestereistä (kuva 11). Valmistettuja rakenteita tutkittiin enantioselektiivisinä tunnistimina, joilla saattaa olla käyttöä kemiallisina sensoreina.²³ Aminohappoina käytettiin alaniinia, seriiniä, leusiinia, isoleusiinia, fenyylialaniinia ja tryptofaania. Substraatti voi sitoutua molekyylien 3-asemassa olevan kiraalisen käsivarren ja sappihapon jäykän ja koveran luonnollisen, ”luolamaisen” rakenteen muodostamaan mikroympäristöön. Tutkimusryhmä havaitsi, että kun kiraalisena käsivartena on L-konfiguraation omaava aminohappo, muodostaa molekyyliatula voimakkaamman kompleksin L-konfiguraation omaavan vieraan (aminohapon) kanssa kuin molekyyliatula, jossa kiraalisena käsivartena on D-konfiguraation omaava aminohappo, ja päinvastoin.



Kuva 11. Hyodeoksikoolihapon ja fenyylialaniinin (**38**) sekä hyodeoksikoolihapon ja tryptofaanin (**39**) muodostamat molekyyliatulat, joita voidaan käyttää mm. enantioselektiivisinä tunnistimina.²³

Virtanen *et al.* ovat valmistaneet deoksikoolihapon ja tryptofaanin konjugaatin, jonka rakennetta ja ominaisuuksia tarkasteltiin yksityiskohtaisesti.²⁴ Konjugaatin valmistuksessa käytettiin Muellerin lähes 100 vuotta sitten kehittämää seka-anhydridimenetelmää^{13,25,26} (kuva 12). Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää nykyaikaisten NMR-spektroskopiitekniikoiden avulla molekyylin rakenteellisia ominaisuuksia ja sen kationoin/anioninsitomisominaisuuksia eri pH-alueilla ja eri konsentraatioissa. L-Tryptofaani on hermoston välittäjäaineena toimivan serotoniinin esiaste, joten se voi mahdollisesti toimia kudoksiin kohdistuvana lääkeaineena. Kationin sitoutumista tutkittiin käyttäen kadmium-ionia (Cd^{2+}), koska sen ionisäde on lähellä biokemiallisesti tärkeitä kalsium (Ca^{2+})- ja sinkki (Zn^{2+})-ioneja, mutta se on NMR-aktiivinen toisin kuin kalsium tai sinkki. Tutkimuksessa käytettiin useita nykyaikaisia NMR-spektroskopiitekniikoita, ESI-TOF-massaspektrometriaa ja molekyyylimallitusta.



Kuva 12. Deoksikoolihapon ja tryptofaanin konjugaatin (41) syntesi.²⁴

NMR-mittauksia varten kationin (Cd^{2+}) ja ligandin (DCA-tryptofaani) ainemäärien suhteita vaihdeltiin siten, että ne olivat 0, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 ja 4:1, ja lopulta liuos kyllästettiin Cd^{2+} -suolalla. ^1H ja ^{13}C NMR -spektreistä havaittiin, että yhdisteen kemialliset siirtymät eivät merkittävästi riippuneet pH:sta tai Cd^{2+} -ionikonsentraatiosta. Tutkimuksissa todettiin, että emäksisissä ja neutraaleissa liuksissa Cd^{2+} -adduktin muodostuminen

voidaan havaita ^1H NMR -spektreissä amidiprotonin kemiallisen siirtymän arvon muutoksena. ^{13}C NMR -spektrissä havaittiin karbonyylihiilen kemiallisen siirtymän muutos kun kationi:ligandi-suhde oli 1:1. Neutraaleissa olosuhteissa tryptofaanin karbonyylihiilen signaali lisäksi leveni.²⁴

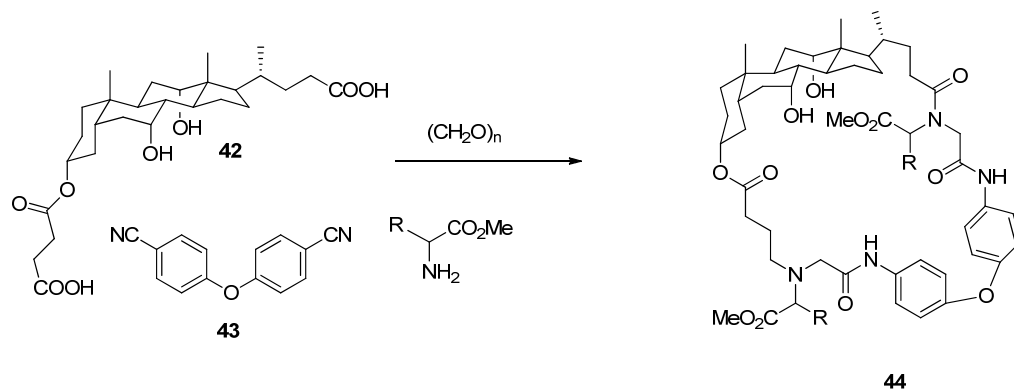
ESI-TOF-massaspektrometriaa käytettiin varmistamaan ionin sitoutuminen ligandiin. Tutkimuksissa kadmium:ligandi-suhdetta muutettiin, jotta kompleksinmuodostumiseen tarvittavan kadmiumin määrä saataisiin selville. Massaspektrometrian avulla todettiin, että natrium (Na^+) ja kadmium (Cd^{2+}) -ionit kilpailivat ligandin aktiivisesta kohdasta. Kadmiumpitoisuuden ollessa alhainen natriumkompleksi muodostui helpommin. Tämän perusteella todettiin, että kadmiumia tarvittiin ylimäärin Cd^{2+} -ligandikompleksin muodostumiseksi. ESI-TOF-massaspektrometrian avulla todettiin myös, että kadmiumperkloraattiperäiset oksianionit osallistuivat adduktien muodostukseen. Kuitenkin kloorin oksianionien vuoksi massaspektrien tulkinta osoittautui ongelmalliseksi. Varautuneiden [ligandi + oksianioni + kationi]⁺ -ionien signaalit havaittiin kaikissa kadmiumkonsentraatioissa. Oksianionin signaalia ei kuitenkaan havaittu heikosti emäksisissä olosuhteissa, vaikka happamissa ja neutraaleissa olosuhteissa se havaittiin.

Kompleksin rakennetta tarkasteltiin myös molekyyli mallituksen avulla. Molekyyli mallituksessa semiempiirisillä PM3- ja *ab initio* Hartree-Fock (HF) -menetelmillä havaittiin kompleksin saavuttavan alimman energiansa, kun tryptofaani oli taipuneena lähelle deoksikoolihapporunkoa. Lisäksi rakennetta vakautti molekyylin sisäinen vetysidos.

Yhdisteen kolmiulotteista rakennetta liuostilassa tutkittiin kaksikulotteisten $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOE-SY NMR-mittausten avulla. Mittaustulosten perusteella havaittiin, että deoksikoolihappo-tryptofaanikonjugaatilla on emäksisissä olosuhteissa erilainen, taipunut rakenne verrattuna neutraaleihin tai happamiin olosuhteisiin. Lisäksi osoitettiin, että Cd^{2+} -ioni sitoutui sappihappo-aminohappokonjugaattiin neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa, kun happamissa olosuhteissa protonit estivät kiinnittymisen sitoutumiskohtaan. Näitä ominaisuuksia voitaneen hyödyntää isäntä-vieraskemiassa.²⁴

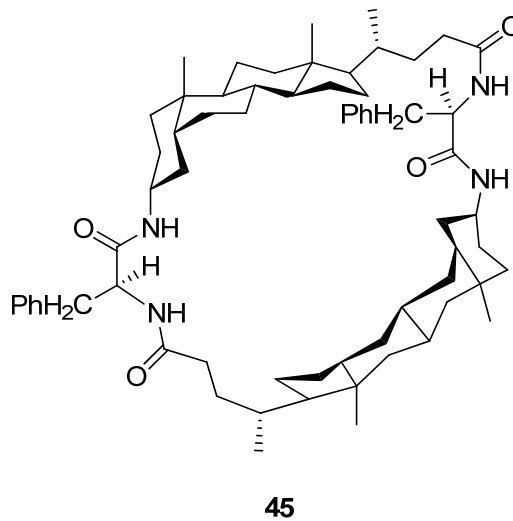
4.2.2 Sykliset reseptorit

Makrosyklisiä rakenteita voidaan käyttää esim. materiaalitieteissä, supramolekyylike-
miassa ja tukirakenteina lääkeainekuljetuksessa. Luonnossa esiintyy makrosyklisiä ra-
kenteita, mutta niitä voidaan valmistaa myös keinotekoisesti.²⁷⁻²⁹ Wessjohann *et al.* ovat
käyttäneet neljän komponentin Ugi-reaktiota sappihappo-aminohappomakrosyklien
valmistamiseen (kuva 13). Ugi-reaktiossa isosyanidi, karbonyyliyhdiste, happo ja amiini
reagoivat, ja se voidaan suorittaa yhdessä reaktioastiassa. Aminohappoina ryhmä on
käyttänyt lysiiniä, alaniinia, seriiniä, asparagiinia, fenyyialaniiniä ja histidiiniä. Tutki-
muksessa havaittiin, että kaikkia aminohappoja, kuten seriiniä tai histidiiniä, ei tarvinnut
suojata ennen Ugi-reaktiota. Valmistettuja rengasrakenteita voidaan mahdollisesti käyt-
tää molekyyliintunnistuksessa ja katalyytteinä.²⁷



Kuva 13. Ugi-reaktion avulla valmistettu sappihappo-aminohappomakrosykli (**44**).²⁷⁻²⁹

Jäykkiä, keinotekoisia peptidirakenteita voidaan valmistaa usealla eri tekniikalla: käyt-
täen ei-luonnollisia peptidien isosteerejä, jäykistäen peptidirunko muodostamalla ren-
gasrakenne tai käyttäen jäykkää välirakennetta eli spacer-molekyyliä. Albert ja Feigel
ovat tutkimuksissaan valmistaneet sappihappopohjaisen pseudoaminohapon (amino- ja
karboksyylihapporyhmän sisältävä keinotekoinen aminohappo) ja L-fenyyialaniinin
konjugaatin (kuva 14), joka muodostaa syklotetrapeptidin. Rakenteen muodostama on-
kalo voi soveltua esim. orgaanisten aineiden kuljettamiseen.³⁰



Kuva 14. Sappihappopohjaisen pseudoaminohapon ja L-fenyylialaniinin muodostama jäykistetty, keinotekoinen peptidianalogi (**45**).³⁰

4.3 Sappihappo-aminohappokonjugaatit gelaattoreina

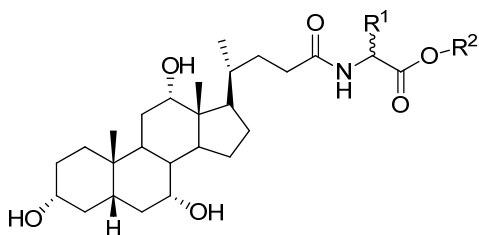
Geelejä voidaan käyttää useissa farmakologisissa sovelluksissa, kuten lääkeaineiden kuljetuksessa sekä aihiolääkkeissä. Lääketieteellisten sovellusten lisäksi geelejä käytetään useissa jokapäiväisissä tuotteissa, kuten piilolinssissä, hiusgeeleissä ja elintarvikkeissa.³¹



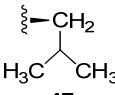
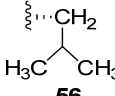
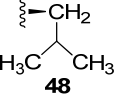
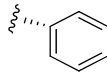
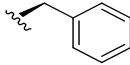
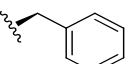
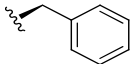
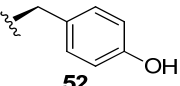
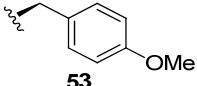

Perinteiset polymeerigeelit muodostuvat ristikkäisistä kovalenttisista polymeereistä, jotka kykenevät turpoamaan ja sitomaan itseensä liuotinta moninkertaisesti omaan painoonsa nähden. Supramolekulaarisissa geeleissä gelaattorimolekyylit puolestaan ovat itsejärjestäytyneet ei-kovalenttisten vuorovaikutusten (esim. vetysidokset, π - π -vuorovaikutukset, van der Waalsin voimat) avulla. Ne muodostavat kolmiulotteisen verkkomaisen rakenteen, joka estää nesteen vapaan liikkumisen.³² Koska ei-kovalenttiset vuorovaikutukset ovat reversiibeilitä, supramolekulaarinen geeli on mahdollista purkaa ja muodostaa uudelleen lämmityksen ja jäähtymisen avulla. Supramolekulaarisia geelejä käytetään mm. nanomateriaalien rakenneosina sekä biolääketieteessä. Geelien ja nanopartikkelien muodostamat epäorgaaniset ja orgaaniset hybridimateriaalit ovat osoittautuneet lupaaviksi materiaaleiksi mm. optiikassa, elektroniikassa sekä polttoaineiden ja aurinkokennojen valmistuksessa.^{31,32}

Geelistä käytetään nimitystä *organogeeli*, kun nestemäinen komponentti on orgaaninen liuotin, ja *hydrogeeli*, kun nesteenä toimii vesi. Nykyään tiedetään useiden funktionaalisten ryhmien omaavan geelinmuodostusominaisuuksia; esimerkkeinä ureat, amidit, sokerit, rasvahapot ja aminohapot. Sappihappopohjaiset organo- ja hydrogeelit ovat suuren kiinnostuksen kohteina mm. niiden muokattavuuden, kiraalisuuden ja biohajoavuuden vuoksi.³³

Supramolekulaaristen geelien valmistuksessa käytetään usein menetelmää, jossa mahdollista gelaattoriyhdistettä kuumennetaan halutussa liuottimessa, kunnes se liukenee täysin. Tämän jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä hitaasti huoneenlämpöön. Kun liuotin jäähtyy, molekyylit voivat saostua kiderakenteettomasti, kiteytyä tai itsejärjestäytyä eikovalenttisten vuorovaikutusten ohjaamina pitkiksi säikeiksi, joista geeli muodostuu. Nesteen sitomiseen ei tarvita suurta määrää gelaattorimolekyylejä, vaan pienikin määrä voi riittää.³³

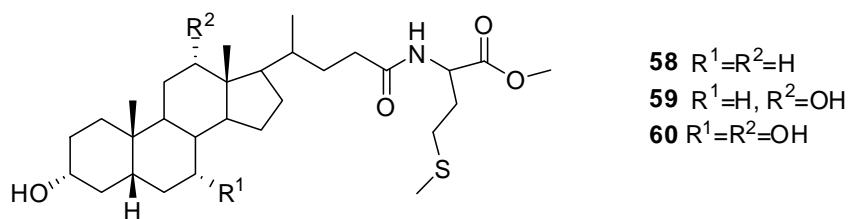
Willemen *et al.* ovat tutkineet koolihapon ja aminohappoestereiden konjugaattien geelinmuodostusominaisuuksia useissa orgaanisissa liuottimissa. Ryhmä valmisti ja tutki yhteensä 14:ää erilaista sappihappo-aminohappoyhdistettä (kuva 15). Tutkimuksissa havaittiin, että aminohapon α -hiilen kiraalisuus vaikutti geelinmuodostusominaisuuksiin. Tämän oletetaan johtuvan tutkitun D-isomeerin heikosta liukenemisestä orgaanisiin liuottimiin ja taipumuksesta mieluummin kiteytyä kuin muodostaa geeli. Samankaltaisia tutkimustuloksia on havaittu myös muiden tutkimusryhmien toimesta.³⁴ Alkyyli-ryhmän tai asymmetrisen ryhmän läsnäolo amidisidoksen läheisyydessä osoittautui tutkimuksen mukaan välttämättömäksi geelin muodostumiselle. Sivuketjun pituuden ei havaittu oleellisesti vaikuttavan geelinmuodostusominaisuuksiin. Sen sijaan liuottimen merkitys geelin muodostuksessa oli huomattava. Tolueneissa kaikki 14 yhdistettä muodostivat geelin, kun taas butyylibentseeni, klooribentseeni ja anisoli muodostivat yhdisteiden kanssa isotrooppisen liuoksen. Sappihapon hydroksyyli-ryhmien määrän vaikutusta geelinmuodostusominaisuuksiin tarkasteltiin valmistamalla konjugaatit litokoolihaposta (LCA, **1**) kenodeoksikoolihaposta (CDCA, **3**) ja deoksikoolihaposta (DCA, **4**). Tutkimuksessa havaittiin, että geelin muodostumiseen tarvitaan kaikki kolme hydroksyyli-ryhmää (asemat 3, 7 ja 12). Tämän todettiin olevan merkittävä ero verrattaessa tulosta vastaaviin kolesterolipohjaisiin organogelaattoreihin.³⁵



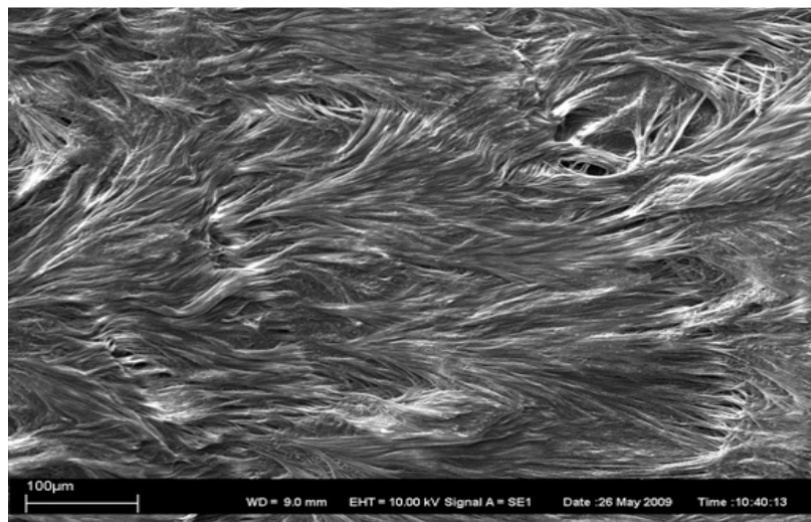
L-isomeerit		D-isomeerit	
R^1	R^2	R^1	R^2
 46	Me	 55	Me
 47	Me	 56	Me
 48	<i>n</i> -Bu	 57	Me
 49	Me		
 50	Et		
 51	<i>n</i> -Bu		
 52	Me		
 53	Me		
 54	Me		

Kuva 15. Sappihaposta ja aminohappojen L- ja D-isomeereistä valmistetut konjugaatit, joiden geelinmuodostusominaisuuksia on tutkittu.³⁵

Sievänen *et al.* ovat valmistaneet ja tutkineet kolme erilaista sappihappo-metioniinikonjugaattia, joissa sappihappoina käytettiin litokoolihappoa, deoksikoolihappoa ja koolihappoa (kuva 16). Geelinmuodostuskokeissa todettiin, että litokoolihapon ja koolihapon konjugaatit muodostivat geelejä (kuva 17), kun taas deoksikoolihapon johdannainen ei geeliä muodostanut. Tämän johtunee siitä, että deoksikoolihappo-metioniinikonjugaatti liukeni tutkittuihin liuottimiin erinomaisesti. Liuottimina käytettiin 29 erilaista liuotinta, jotka esitetään taulukossa 1. Tavanomaisten rakennetutkimusten lisäksi kserogeelejä tarkasteltiin ^{13}C CP/MAS NMR-mittausten avulla. Lisäksi tutkimusryhmä ratkaisi valmistamiensa sappihappo-metioniinikonjugaattien kiderakenteet.³⁶



Kuva 16. Kolme sappihappo-metioniinikonjugaattia, joiden geelinmuodostusominaisuuksia on tutkittu eri liuottimissa.³⁶



Kuva 17. SEM-kuva litokoolihappo-metioniinikonjugaatin tolueenigeelistä valmistetusta kserogelistä.³⁶

Taulukko 1. Sappihappo-metioniinikonjugaattien geelinmuodostuskokeissa käytetyt liuottimet ja tutkimustulokset.³⁶

Liuotin	58	59	60
CHCl ₃	S+	S+	S+
CH ₂ Cl ₂	S+	S+	S+
CCl ₄	S,P	S	S,P
Klooribentseeni	S	S+	S
Tolueeni	S,G	S+	S,G [†]
<i>p</i> -Ksyleeni	S,G	S	S,P
<i>m</i> -Ksyleeni	S,G	-	S,P
<i>o</i> -Ksyleeni	S	-	S,G [†]
Kumeeni	S,G-	S	S,P
Mesityleeni	S,G-	S	S,P
Anisoli	S	S,C	S+
Bentseeni	G	S+	G
<i>t</i> -Butyylibentseeni	S,G-	S,C	S,G-
Syklohekseeni	S	S	S
Etyyliasettaatti	S,C	S+	S+,C
Asetonitriili	S,C	S+	S,C
Heksaani	I	I	I
Asetoni	S,P	S+	-
DMF	S	S+	S+
Etikkahappo	S	S+	S+
THF	S	S+	S+
Metanoli	S,C	S+	S+
2-Propanoli	S	S	S
1-Butanoli	S	S+	S+
1-Oktanoli	S	S	S+
Sykloheksanoli	S	S	S
2M HCl	I	S	S
Ionivaihdettu vesi	I	S	S
Pyridiini	S+	-	S+

G = geeli, G[†] = läpinäkyvä geeli, G- = heikko geeli, S = liukenee kuumennettaessa, S+ = liukenee ilman kuumennusta, P = saostuu jäähtyneenä, C = kiteytyy jäähtyneenä, I = ei liukene, - = ei määritetty

4.4 Sappihappo-aminohappokonjugaatit farmakologisissa sovelluksissa

Jotta lääkeaine olisi tehokas, sen tulee saavuttaa kohdekudos ja aiheuttaa haluttu reaktio. Perinteisesti lääkeaineiden ominaisuuksia on yritetty parantaa tekemällä niistä synteettisiä johdoksia, joilla olisi alkuperäiseen lääkeaineeseen verrattuna paremmat fysikokemialliset ominaisuudet. Aihiolääkkeet, joista käytetään myös nimitystä *prodrug*, ovat lääkeaineen farmakologisesti inaktiivisia johdoksia, joista lääkeaine vapautuu kontrollidusti elimistössä joko kemiallisen tai entsyymaattisen reaktion kautta.³⁷

Suurin este veteen liuenneiden aineiden vapaalle kulkeutumiselle elimistössä on solukalvo. Se vaikuttaa aineen imeytymiseen sekä siihen, jakaantuuko aine solunulkoiseen vai solunsisäiseen tilaan. Solukalvo vaikuttaa myös aineen pääsyyn keskushermostoon ja muihin kudoksiin, sekä aineen erittymistapaan ja nopeuteen.²¹

Aineet kulkeutuvat kalvorakenteiden läpi suodattamalla eli filtraatiolla, diffuusiolla tai aktiivisen kuljetuksen avulla. Filtraatio ja diffuusio ovat passiivisia mekanismeja, ja niissä aine kulkee väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan, eikä siirtyminen kuluta energiaa. Filtraation ja diffuusion edellytyksenä on riittävän pieni molekyylikoko ja lipidiliukoisuus sekä ionisoitumiskyky. Aktiivinen kuljetus huolehtii isokokoisten tai polaaristen aineiden kuljetuksesta solukalvon läpi. Aktiivisesta kuljetuksesta huolehtivat erityiset kuljettajaproteiinit, jotka muistuttavat solukalvon reseptoreita ja läpäisevät solukalvon useita kertoja.³⁴

Lääkkeen kalvokuljetuksen uskottiin aikaisemmin tapahtuvan diffuusion avulla. Nykyiset tutkimukset kuitenkin osoittavat, että useimpien lääkeaineiden kuljetuksesta lipidikalvojen läpi huolehtivat erityiset kuljettajaproteiinit. Tutkimusmenetelmien kehittymisen on mahdollistanut kuljettajaproteiinien rakenteen ja toiminnan yksityiskohtaisemman tarkastelun.^{4,21}

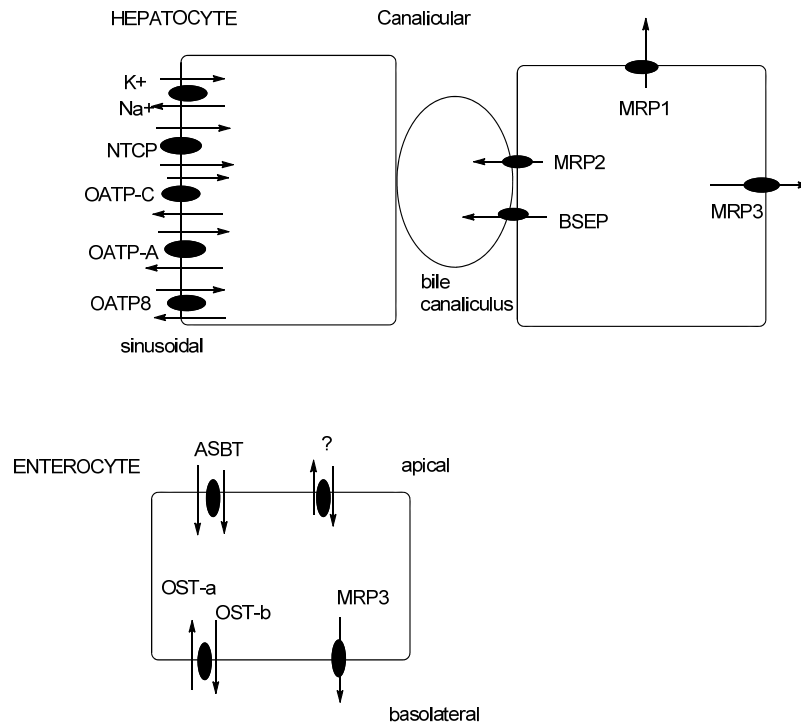
Oraalisesti annosteltavien peptidilääkeaineiden ongelmana on niiden hajoaminen ruoansulatuskanavan happojen ja entsyymien vaikutuksesta, ennen kuin ne saavuttavat kohdekudoksensa.²¹ Tämän vuoksi tällaisia lääkeaineita tulisi muokata siten, että ne saavuttavat aktiivisina ohutsuolen, jossa suurin osa imeytymisestä tapahtuu.

Peptidin konjugoinnin sappihappoon on todettu parantavan peptidin aineenvaihdunnallista pysyvyyttä ja tehostavan aineen imeytymistä ohutsuolesta. Sappihappojen amino- happo- ja peptidikonjugaatteja onkin tutkittu lääkeainekuljetuksessa useiden eri tutkimusryhmien toimesta. Esimerkiksi Kramer tutkimusryhmineen on osoittanut, että peptidipohjaisen lääkeaineen konjugointi sappihapon 3-asemaan johtaa parhaisiin molekyy- lintunnistus- ja kuljetusominaisuuksiin verrattuna lääkeaineen konjugointiin muihin (7,12) asemiin. Peptidisidoksen on todettu tehostavan hydrolyyttistä pysyvyyttä mole- kyyllintunnistuksen ja kuljetuksen aikana.³⁸

Jotta sappihapot (ja konjugoidut sappihapot) voisivat kulkeutua solukalvojen läpi, ne tarvitsevat kuljettajan. Tärkein näistä on Na⁺-riippuva kuljettajaproteiini (NTCP, *Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*),^{39,40} jossa solukalvojen välisestä kuljetukses- ta huolehtii Na⁺/K⁺-ATPaasi.

Apikaalinen Na⁺-riippuvainen sappisuolojen kuljettaja (ASBT, *Apical Sodium- Dependent Bile Salt Transporter*) toimii samankaltaisella mekanismilla kuin NTCP. ASBT on sijoittunut enterosyyttien apikaalipuolelle, jossa se huolehtii sappihappojen uudelleenimeytymisestä ohutsuolesta. NTCP puolestaan huolehtii sappihappojen imey- tymisestä heptosyytteihin porttilaskimon verenkierrosta. Kaavakuva sappihappojen kuljettajaproteiinien sijainnista eri solukalvoilla esitetään kuvassa 18.

Na⁺-riippumattomassa systeemissä kuljettajina toimivat useat orgaaniset anioninkuljet- tajapeptidit (OATP, *Organic Anion Transporting Polypeptides*), jotka huolehtivat eli- mistön anioninvaihdosta.



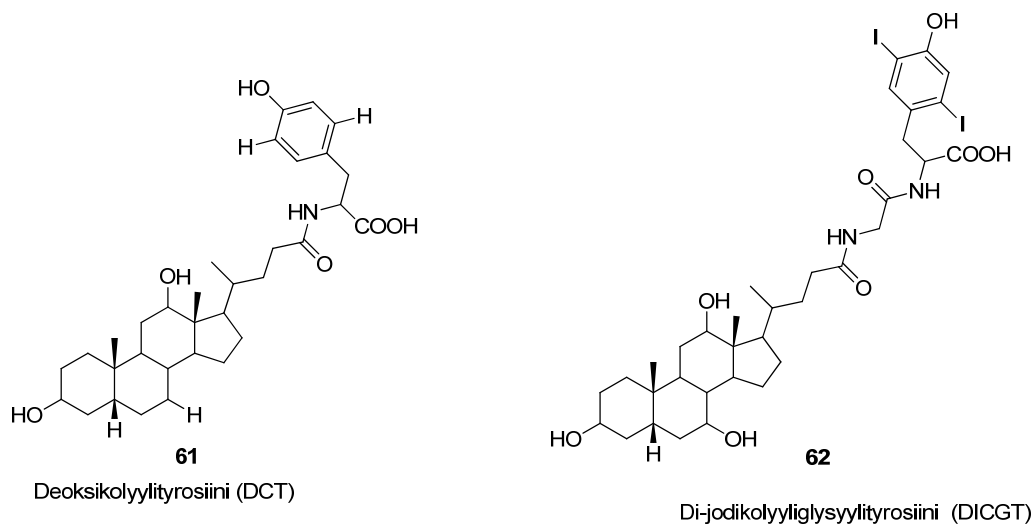
Kuva 18. Kaavakuva sappihappojen kuljettajaproteiinien sijainnista hepatosyytissä ja enterosyytissä.³⁹

Banerjee tutkimusryhmineen on valmistanut sappihappo-metaaniosulfonaatti (MTS)-konjugaatin, jonka uskotaan voivan vaikuttaa ASBT:n sappihappoa sitoviin ominaisuuksiin.⁴¹ Konjugaatti antaa tietoa ASBT:n proteiini-ligandi- vuorovaikutuksista, ja sitä voidaan käyttää myös muiden sappihappojen kuljettajamolekyylien tunnistamisessa.

4.4.1 Sappihappo-aminohappokonjugaatit viruslääkkeinä

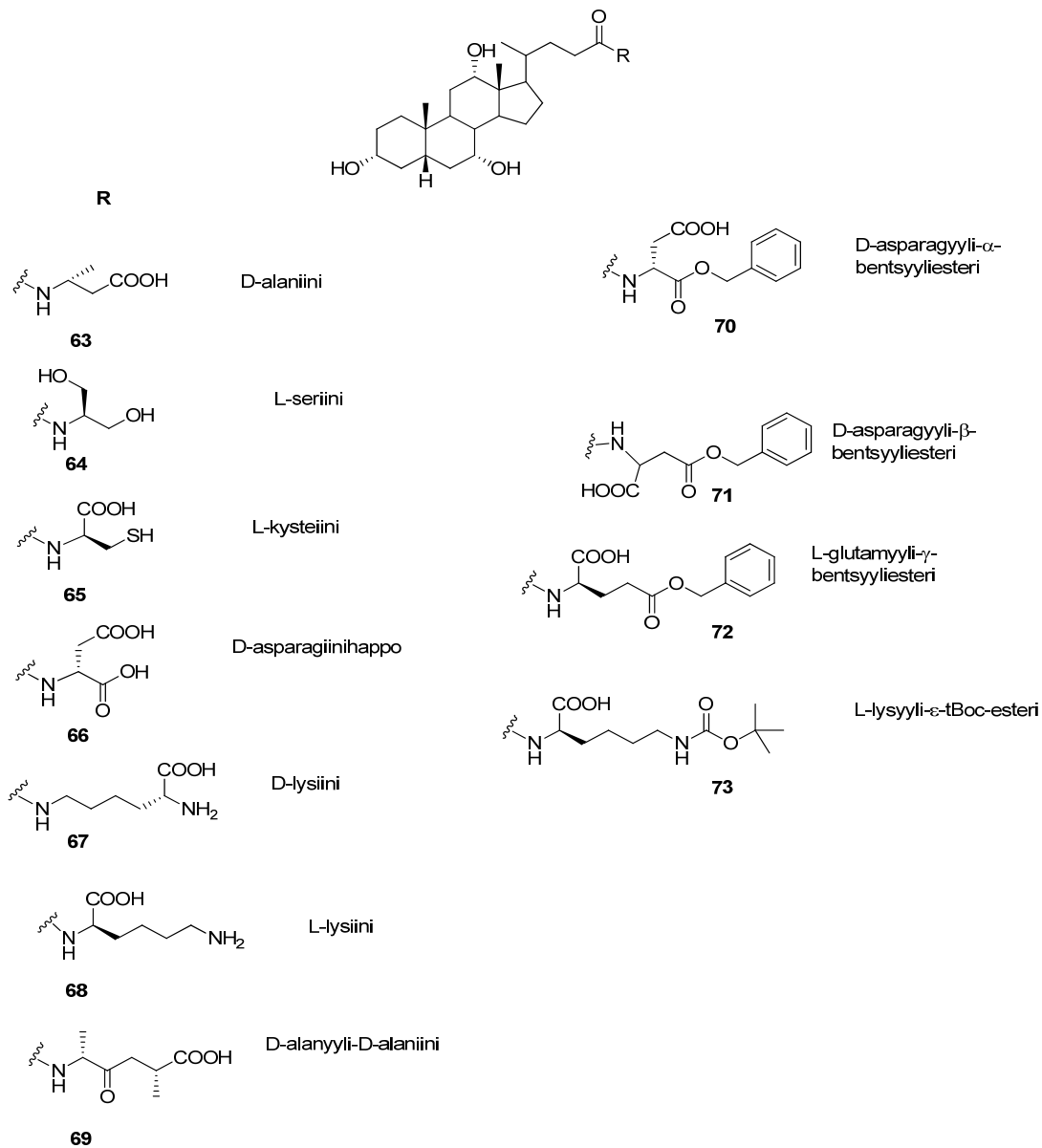
Virusten aiheuttamiin sairauksiin ei aiemmin ole ollut tehokkaita lääkkeitä. Nykyisin on kuitenkin onnistuttu kehittämään joitakin viruslääkkeitä, jotka tuhoavat viruksia suoran kontaktin kautta. Virusidien toiminta perustuu niiden kykyyn tuhota viruksen proteiinikuori eli kapsidi tai sitoa viruksen pintaproteiini sellaiseen muotoon, että sen toiminta estyy.

Nykyisten HIV-lääkkeiden ongelmana (spermisidi-nonoksinoli-9) on niiden sytotoksisuus ihmisluille. Koska solujen vahingoittumista pyritään välttämään, muun muassa sappihapon tyrosiinikonjugaatteja on tutkittu mahdollisina anti-HIV-lääkkeinä (kuva 19). Erityisesti deoksikolylyityrosiiniin (**61**) todettiin olevan anti-HIV-1-aktiivinen.^{42, 43}



Kuva 19. Joidenkin potentiaalisten sappihaposta ja tyrosiinista johdettujen anti-HIV-lääkkeiden rakenteet.⁴²

Myös Øie tutkimusryhmineen on valmistanut useita koolihappo-aminohappokonjugaatteja, joiden kykyä inhiboida HIV-1-proteaasin toimintaa on tutkittu CaCo-2-solulinjan avulla.⁴³ Aminohappoina käytettiin lysiiniä, alaniinia, seriiniä, kysteiniä ja asparagiinihappoa. Lisäksi sappihappoon liitettiin joitakin dipeptidejä tai aminohapon estereitä. Tavoitteena oli valmistaa hybridejä, jotka sappihapon kantajamolekyylit tunnistaisivat ja joilla olisi HIV-1-proteaasia inhiboivia ominaisuuksia. Tutkimuksessa aminohappo liitettiin sappihapon 24-asemaan. Valmistettujen molekyylien rakenteet esitetään kuvassa 20.



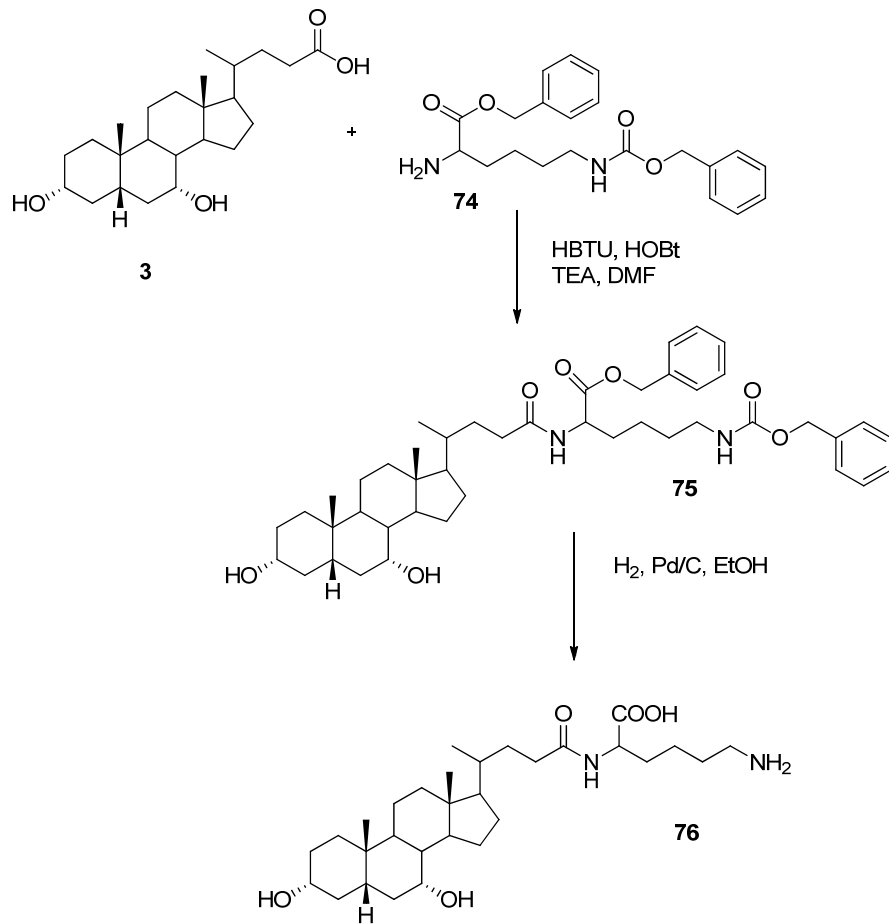
Kuva 20. HIV-1-proteasaa inhiboivia sappihappo-aminohappokongugaatteja.⁴³

In vitro -kokeissa havaittiin, että sivuketjun pituudella oli merkitystä kuljetuksen kanalta. Pituudeltaan 14 Å mittainen sivuketju todettiin toimivaksi. Seriinin hydroksyyli-ryhmä ei haitannut sitoutumista kantajamolekyyliin, kun taas kysteiinin hapan sulfhydryyliryhmä vaikutti häiritsevästi. Huomattavaa oli, että isot hydrofobiset ryhmät, kuten bentsyyli-ryhmä, tehostivat sitoutumista kantajamolekyyliin.⁴³

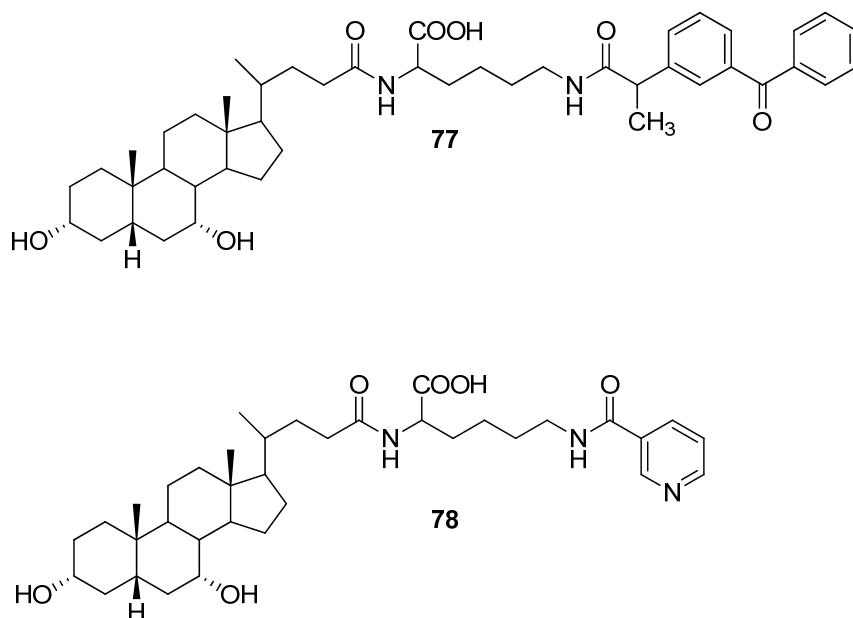
4.4.2 Sappihappo-aminohappokonjugaatit aihiolääkkeissä

Polli *et al.* ovat tutkineet kahden aineen, tulehduskipulääke ketoprofeenin ja B-vitamiini niasiinin, konjugointia sappihappoon lysiinivälikkeen avulla. Tutkimusryhmä valmisti kenodeoksikoolihapon (CDCA) ja lysiinin konjugaatteja, joihin em. molekyylit liitettiin. Yhdisteiden valmistaminen esitetään kuvassa 21. Kuvassa 22 puolestaan esitetään valmistettujen yhdisteiden rakenteet. Sappihappoon konjugoitiin bentsyylikarbaamaattiryhmillä (CBz) suojattu lysiini HBTU:n (2-(1*H*-bentsotriatsoli-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti) ja HOBt:n (hydroksibentsotriatsoli) avustuksella. Tämän jälkeen suojausryhmät poistettiin käyttäen 10-prosenttista Pd/hiili-reagenssia. Saatuun välituotteeseen konjugoitiin niasiinin hydrokloridi tai tionyylikloridilla aktivoitu ketoprofeeni.

In vitro -tutkimuksissa havaittiin, että konjugoinnin avulla lääkeaineen imeytymisnopeutta voitiin säädellä ja että entsyymaattinen pysyvyys tehostui. Lisäksi molemmat konjugaatit inhiboivat taurokolaatin sitoutumista ASBT-proteiiniin.⁴⁴

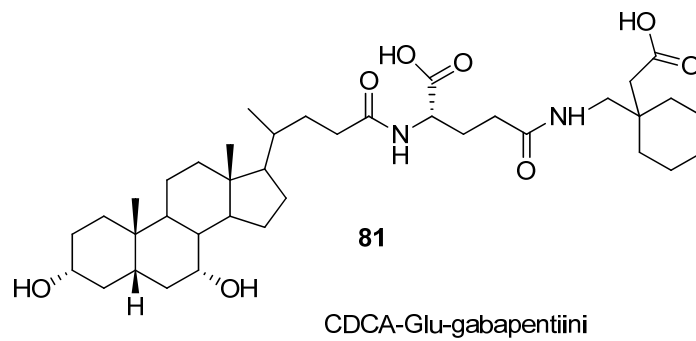
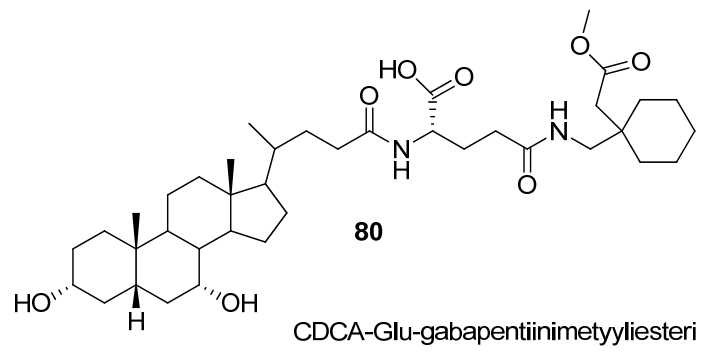
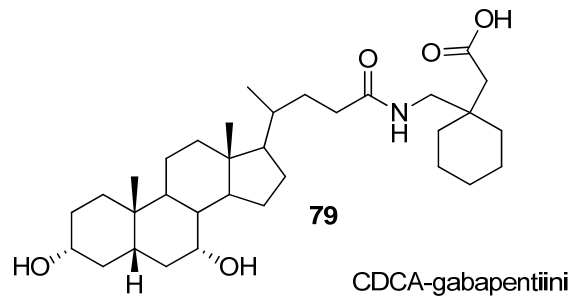


Kuva 21. Kenodeoksikoolihapon ja lysiinin konjugaatin (**76**) valmistaminen.⁴⁴



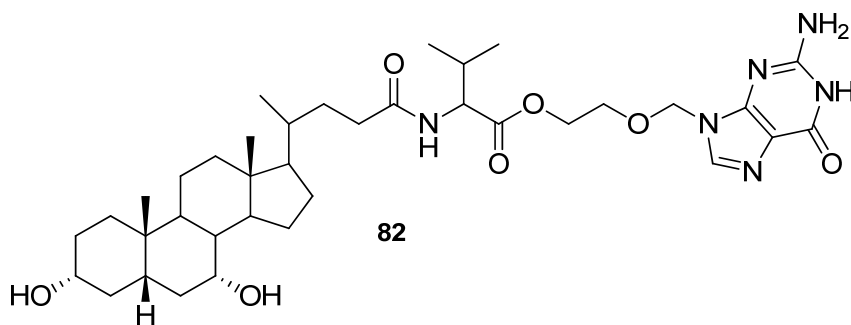
Kuva 22. Kenodeoksikoolihappo-lysiini-ketoprofeeni (**77**) ja -niasiini (**78**) konjugaattien rakenteet.⁴⁴

Polli *et al.* ovat tutkineet myös gabapentiinin oraalisen biosaatavuuden tehostamista. Tutkimusryhmä liitti gabapentiinin kenodeoksikoolihaposta (CDCA) ja glutamiinihaposta valmistettuun konjugaattiin ja tutki yhdisteen absorptiota hASBT:n avulla. Gabapentiini on gamma-aminovoihapon (GABA) analogi, jota käytetään neuropaattisen kivun hoidossa sekä lisälääkityksenä vähentämään kouristuksia aikuisten epilepsiakohtauksissa. Ryhmä tutki kolmea negatiivisen varauksen omaavaa yhdistettä, CDCA-gabapentiiniä (**79**), CDCA-Glu-gabapentiinin metyyliesteriä (**80**) sekä CDCA-Glu-gabapentiiniä (**81**) (kuva 23), ja niiden hASBT inhibiitiota käyttäen taurokolaattia substraattina. Inhibiitiotutkimuksissa taurokolaatin kanssa havaittiin, että CDCA-gabapentiini ja CDCA-Glu-gabapentiinin metyyliesteri tehostivat gabapentiinin absorptiota hASBT:n välityksellä.^{45,46}



Kuva 23. CDCA-konjugaatit, joiden ominaisuuksia gabapentiinin absorptioon tehostamiseksi hASBT:n välityksellä tutkittiin.^{45,46}

Asikloviiri on antiviraalinen lääkeaine, joka inhiboi herpes-viruksen kasvua. Koska se imeytyy huonosti ohutsuolesta, on sen biosaatavuus suun kautta annettuna vain n. 20 %. Polli tutkimusryhmineen⁴⁷ on tehostanut asikloviirin biosaatavuutta konjugoimalla sen sappihappoon valyiinivälkkeen avulla (kuva 24). Tutkimuksissa todettiin, että asikloviirin konjugointi valyylidenodeoksikolaatin kanssa nosti biosaatavuuden lähes kaksinkertaiseksi pelkkään asikloviiriin verrattuna. Konjugaateissa sappihappoina käytettiin kenodeoksikoolihappoa (CDCA), deoksikoolihappoa (DCA), koolihappoa (CA) ja ursodeoksikoolihappoa (UDCA). Konjugaatin virusta inhiboivia ominaisuuksia tutkittiin sekä *in vivo*- että *in vitro* -menetelmin.



Kuva 24. Asikloviirin valyylidenodeoksikolaatti.⁴⁷

Tyypin 2 diabetes on krooninen metabolasairaus, jossa sairaudelle tyypillinen verensokerin kohoaminen (hyperglykemia) johtuu insuliinin erittymishäiriöstä tai insuliinin heikosta hyödyntämisestä.⁴⁸ Koska insuliini hajoaa entsymaattisesti ruoansulatuskanavassa, on insuliini annosteltava pistoksin. Siksi oraalisesti annosteltavalle insuliinivalmisteelle olisi tarvetta.

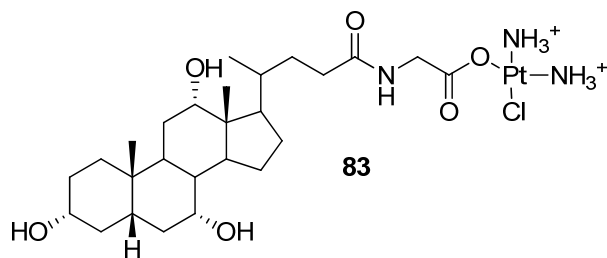
GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*) on inkretiini-hormoni, jota vapautuu ohutsuolen L-soluista aterioinnin jälkeen. Sitä tutkitaan antidiabetes-ominaisuuksiensa vuoksi varsinkin tyypin 2 diabeteksen yhteydessä. Useat tutkimusryhmät ovat valmistaneet deoksikoolihappo-lysiini-insuliinikonjugaatteja tarkoituksenaan kehittää pitkävaikutteinen GLP-1-analogi.

Sekä Byun että Lee tutkimusryhmineen ovat valmistaneet koolihaposta, litokoolihaposta tai deoksikoolihaposta ja lysiinistä konjugaatteja, johon insuliini on konjugoitu. *In vitro*-tutkimuksissa havaittiin, että insuliinin laskostuminen, entsyyminkestävyys, lipofiili-

syys ja solukalvon läpäisykyky oli säilynyt. *In vivo* -kokeissa deoksikoolihappo-lysiini-insuliinikonjugaatin havaittiin alentavan plasman glukoositasoja pitkävaikutteisesti.^{49, 50}

4.4.3 Sappihappo-aminohappokonjugaatit kemoterapiassa

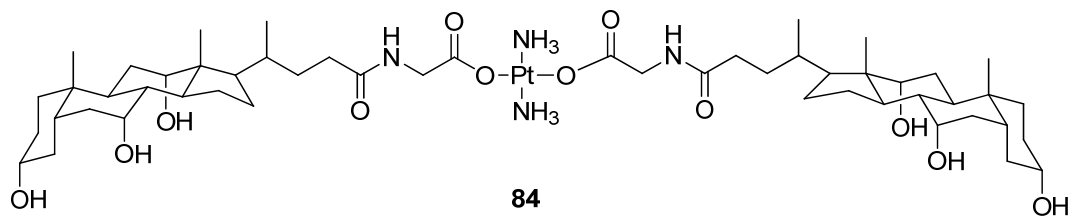
Kemoterapialääkkeiden ongelmana on usein niiden haitallisuus kasvaimen ulkopuolisille soluille ja/tai syöpäsolujen sytostaatteja vastaan kehittämä resistenssi. Jo v. 1972 kehitetyn syöpälääkkeen, *cis*-diammoniumdiklooriplatina(II):n eli *cis*-platinan, ongelmina ovat olleet sen aiheuttamat neurotoksisuus, munuaistoksisuus sekä pahoinvointi. Ratkaistakseen näistä aiheutuvat ongelmat Criado *et al.* ovat valmistaneet konjugaatin *cis*-diammiiniplatina(II)dikloridista ja Na-kolyyliglysiinista (**83**, kuva 25).



Kuva 25. *Cis*-diammiiniplatina(II)dikloridin ja Na-kolyyliglysiinin konjugaatti.⁵¹

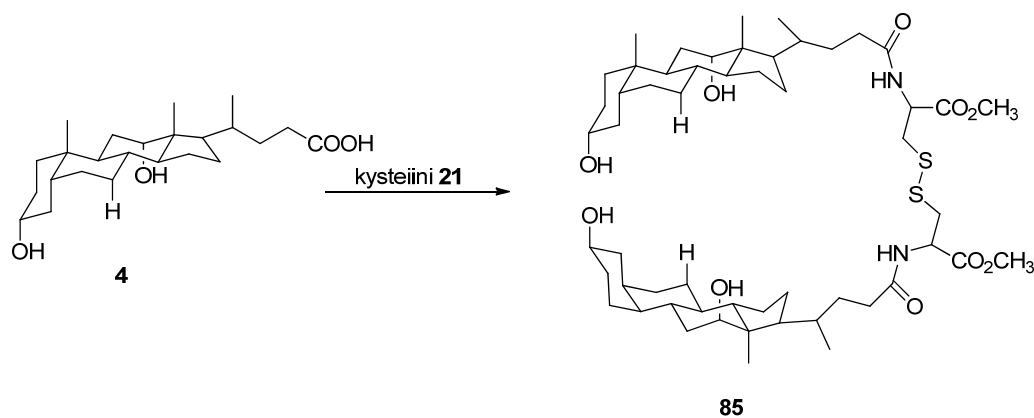
Tällaisia sappihappojohdannaisia kutsutaan Bamet-yhdisteiksi. ("Ba" tulee sanasta sappihappo (bile acid) ja "met" metallista (Pt)). Tutkittaessa Bamet-yhdisteiden pysyvyyttä ja sytostaattisia ominaisuuksia *in vitro* -olosuhteissa, havaittiin, että *cis*-platinan konjugointi sappihappoon tehosti lääkeaineen sytostaattisia ominaisuuksia sekä paransi kohdentamista haluttuun kudokseen tai elimeen.⁵¹

Vaikka kemoterapialääkkeinä on käytetty vuosikymmenten ajan vain *cis*-rakenteen omaavia yhdisteitä, viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että myös *trans*-muotoisilla yhdisteillä saattaisi olla potentiaalista käyttöä kemoterapiassa.⁵² Rodriguez-Fernandez *et al.* ovat valmistaneet konjugaatin (**84**) *trans*-diammiiniplatina(II)dikloridista ja kahdesta kolyyliglysiinimolekyylisestä (kuva 26). Valmistetun konjugaatin havaittiin olevan vesiliukoinen ja sytotoksinen. *In vitro* -testien perusteella havaittiin, että yhdisteen halidi voidaan korvata karboksylaattiligandilla. Tämä lisää yhdisteen vesiliukoisuutta ja parantaa sen hydrolyyttistä kestävyyttä.⁵²



Kuva 26. Trans-diammiini(II)platinan ja dikolyyliglysiinaatin konjugaatin (**84**) ehdotettu rakenne.⁵²

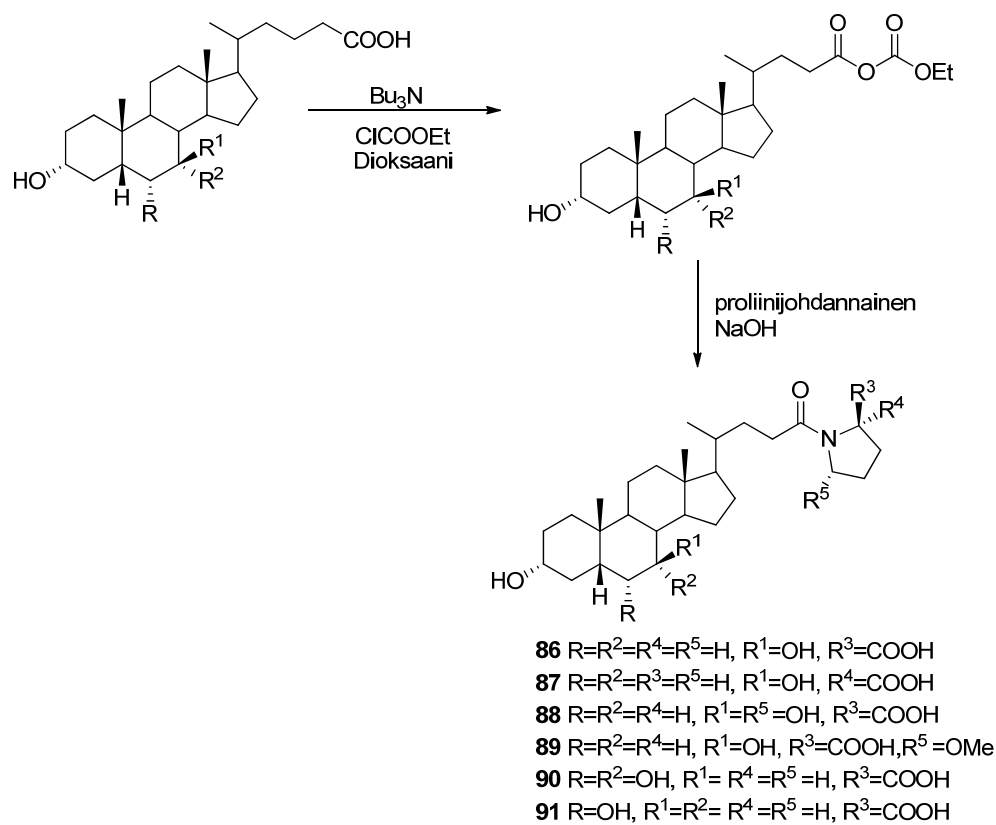
Ju *et al.* ovat valmistaneet yhdeksän dimeeristä deoksikoolihappo-aminohappokonjugaattia, jotka pyrkivät matkimaan syklisiä peptidejä. Aminohappoina käytettiin kysteiniä (**21**, kuva 27) ja lysiiniä (**26**). Tutkimuksissa havaittiin yhdisteiden inhiboivan mm. MCF-7-syöpäsolujen kasvua. Tämän oletettiin johtuvan ”sandwich”-tyyppisestä rakenteesta.⁵³



Kuva 27. Deoksikoolihapon kysteini-dimeeri, jossa ”sandwich”-rakenne.⁵³

4.4.4 Sappihappo-aminohappokonjugaatit muissa farmakologisissa sovelluksissa

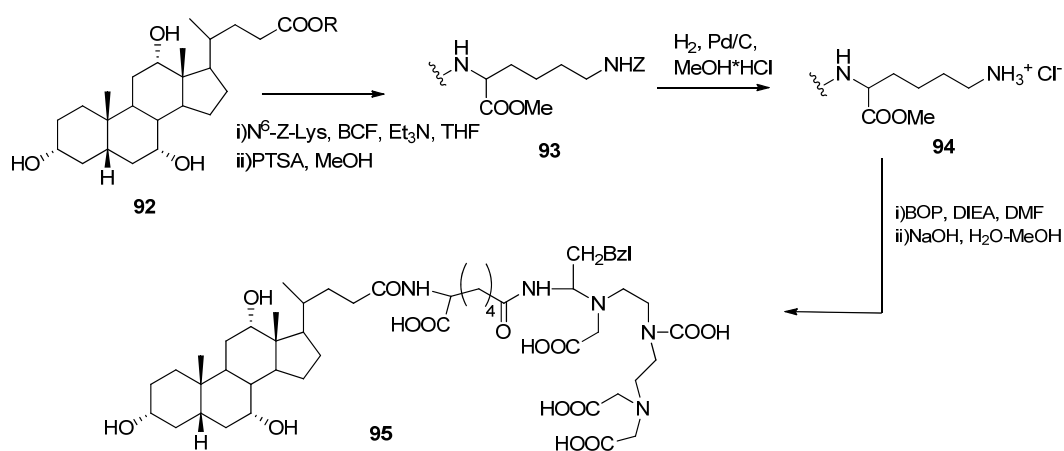
Kolesterolipohjaisten sappikivien hoitoon on käytetty ursodeoksikoolihappoa (UDCA). Pitkäaikaisessa käytössä sen on havaittu kertyvän sappinesteeseen. Lisäksi se imeytyy heikosti ohutsuolesta ja suoliston mikrobit muodostavat siitä myrkyllistä litokoolihappoa. Näiden haittavaikutusten pienentämiseksi Roda *et al.* ovatkin tutkineet mahdollisuutta konjugoita ursodeoksikoolihappoon (2), hyodeoksikoolihappoon (6) ja hyokoolihappoon (7) sopivaa aminohappoa. Aminohappoina käytettiin L-proliinia, D-proliinia, 4-hydroksi-L-proliinia ja 4-metoksi-L-proliinia (kuva 28). Aminohapoksi valittiin proliini tai sen johdannainen sen sisältämän typpiätomim vuoksi. Tämän rakenteen tiedetään estävän bakteerien aikaansaamaa deamidaatiota ja näin estävän ei-toivottujen metaboliittien muodostumista.⁵⁴ Valmistettujen yhdisteiden *in vitro*- ja *in vivo* -tutkimukset osoittivat, että valmistetut yhdisteet ovat soveltuvia kolesterolipohjaisten sappikivien liuotushoitoon.⁵⁴



Kuva 28. Ursodeoksikoolihapon (2), hyodeoksikoolihapon (6) ja hyokoolihapon (7) proliinikonjugaattien valmistaminen.⁵⁴

Paitsi syöpälääkkeenä, sappihappojen aminohappokonjugaattien metallikomplekseja on käytetty myös magneettiresonanssikuvauksen (MRI) varjoaineina. Magneettikuvausvarjoaineet poikkeavat vaikutusmekanismeiltaan perinteisistä röntgenvarjoaineista: ne vaikuttavat eri kudosten relaksaatioaikoihin aiheuttaen tutkimuksessa kontrastieroja kudosten välille. Suoneen ruiskutettavat magneettikuvausvarjoaineet ovat lähes kaikki gadolinium-metallin kelaatteja. Niiden vaikutus perustuu paramagneettiseen ilmiöön.²¹

Anelli *et al.* ovat valmistaneet ja tutkineet sappihappo-lysiinikonjugaattien gadolinium(III) komplekseja tarkoituksenaan valmistaa magneettikuvausvarjoaineita. Tutkimuksissa havaittiin, että ns. kolmannen sukupolven konjugaatit, joissa koolihappo on konjugoitu lyysiiniin (kuva 29), ovat lupaavia yhdisteitä maksan varjoainekuvaukseen.^{55,56}



Kuva 29. Sappihappo-lysiinikonjugaatti (**95**), johon voidaan konjugoida gadolinium-(II)-ioni.^{55,56}

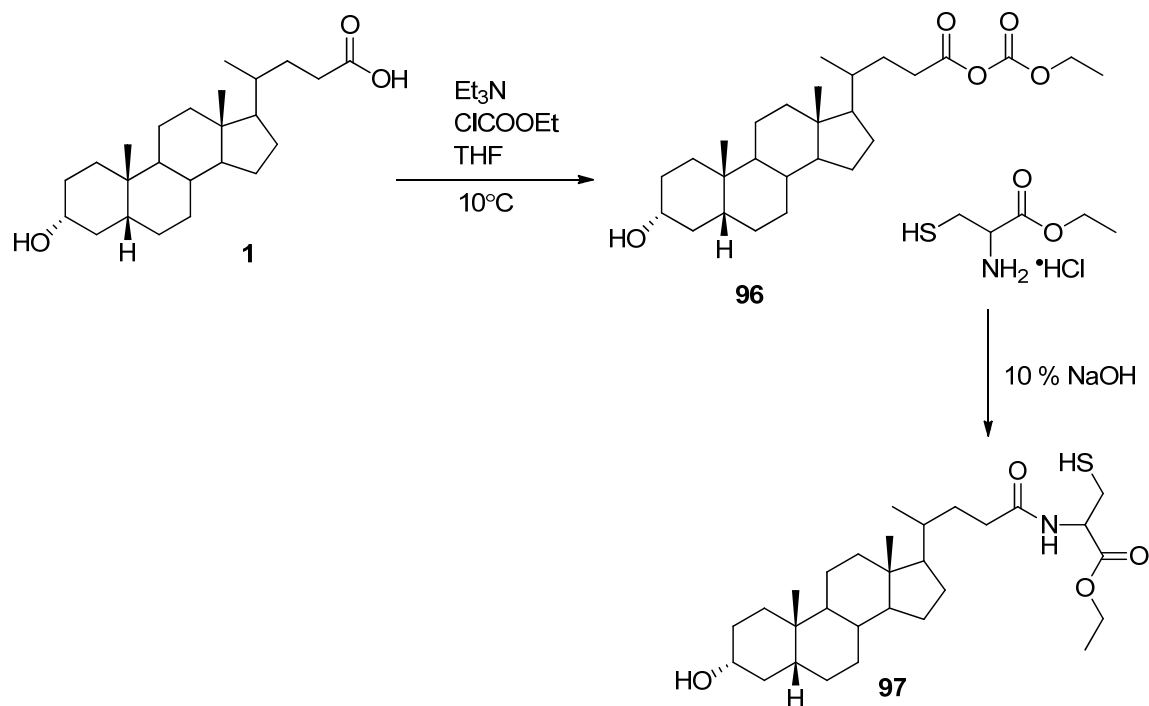
4.5 Sappihappo-aminohappokonjugaatit muissa sovelluksissa

Kulta on kiehtonut tutkijoita antiikin ajoista saakka. Tänä päivänä tutkijoiden kiinnostuksen kohteena ovat erityisesti kultananopartikkelit (AuNP). Kultananopartikkelit ovat pysyviä ja monikäyttöisiä metallinanopartikkeleita, joita voidaan käyttää mm. materiaalitieteissä, elektroniikassa, optiikassa ja lääketieteessä. Erityisesti kultananopartikkelit

voivat toimia solunsisäisinä vektoreina, koska niiden kokoa voidaan säädellä 0,8–200 nanometrin välillä.⁵⁷ Ensimmäisen kultananopartikkelien synteessin esitti Turkevitch jo v. 1951.⁵⁸ Menetelmässä HAuCl_4 pelkistettiin käyttämällä sitraattipelkistintä. Tämän jälkeen on esitetty useita muitakin valmistustapoja.

Rajendiran tutkimusryhmineen on valmistanut vedessä stabiileja kulta- ja hopeananopartikkeleita, jotka on päällystetty koolihapon glysiini- tai tauriinikonjugaatteja käyttäen. Valmistettuja yhdisteitä on tutkittu käyttämällä läpäisyelektronimikroskopiaa (TEM), röntgendiffraktiota ja FT-IR-spektroskopiaa. Tutkimuksissa havaittiin, että hopea- ja kultaionien kiinnittymiseen (biosorptioon) solujen tai niiden tuottamien eksopolymeerien pinnoille vaadittiin hapetus-pelkistys-reaktio, jossa ioninen metalli pelkistyy metalliseen muotoonsa. Ryhmä havaitsi myös, että sappihapon konsentraatiota säätelemällä voitiin vaikuttaa nanopartikkelin kokoon.⁵⁹

Sievänen *et al.* ovat tutkineet litokoolihaposta (**1**) ja L-kysteiinistä (**21**) valmistettua yhdistettä, jonka avulla on stabiloitu kultananopartikkeleita. Sappihappojohdannaisen valmistamiseksi käytettiin seka-anhydridimenetelmää, jonka avulla litokoolihappoon saatiin liitettyä kysteiinin etyyliesteri (kuva 30). Kultananopartikkelit valmistettiin NaBH_4 -pelkistyksellä. Menetelmässä pelkistettiin kultaionien lähteenä toimiva HAuCl_4 litokoolihapon-kysteiinikonjugaatin läsnäollessa. Koko valmistusreitti vaati yhteensä vain kaksi vaihetta.⁵⁷ Valmistetut nanopartikkelit analysoitiin käyttämällä alkuaineanalyysia, läpäisyelektronimikroskopiaa (TEM) sekä ^{13}C CP/MAS NMR -spektroskopiaa. Tutkimuksissa havaittiin, että nanopartikkelit saostuivat poolisissa liuottimissa. Tämän oletettiin johtuvan niiden amfifiilisestä luonteesta.

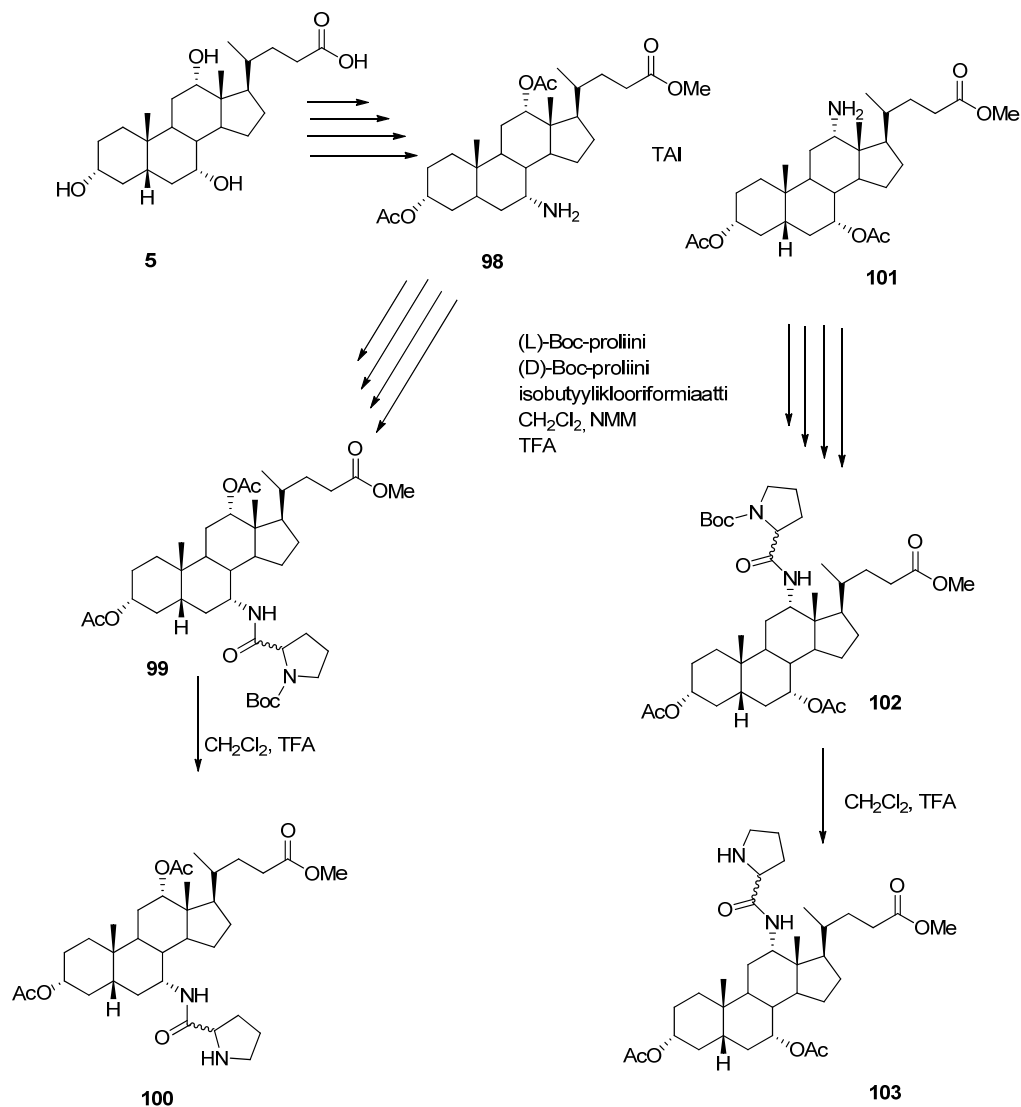


Kuva 30. Litokoolihaposta ja L-kysteiinistä seka-anhydridimenetelmällä valmistettu konjugaatti (**97**).⁵⁷

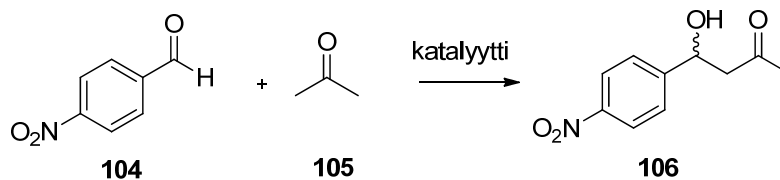
Sappihappojen aminohappokonjugaatteja voidaan käyttää myös enantioselektiivisyyttä edistävinä katalyytteinä. Iuliano *et al.* ovat valmistaneet koolihapon ja deoksikoolihapon L- ja D-proliinijohdannaisia, jotka voivat toimia organokatalyytteinä edistäen asymmetristä suoraa aldolireaktiota. Proliini haluttiin konjugoida sappihapon steroidirunkoon amidisidosta käyttäen, minkä vuoksi tutkimusryhmä muutti selektiivisesti hydroksyyli-ryhmän aminoryhmäksi. Tämän jälkeen aminoryhmään liitettiin Boc-suojattu proliini (kuva 31). Lopuksi proliinin Boc-suojaus purettiin ja valmistettujen konjugaattien aktiivisuutta ja enantioselektiivisyyttä tutkittiin asetonin ja 4-nitrobentseenin suoran asymmetrisen aldolireaktion avulla (kuva 32). Reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografian (TLC) avulla ja tuotteiden rakenteet määritettiin käyttäen NMR-spektroskopiaa.⁶⁰

Tutkimuksissa havaittiin, että yhdisteiden aktiivisuus ja enantioselektiivisyys eivät riipuneet ainoastaan proliinin konfiguraatiosta, vaan myös asemasta, johon proliini oli konjugoitunut. Aktiivisin ja enantioselektiivisin organokatalyyttinen vaikutus saatiin

kun proliini konjugoitiin koolihapon 12-asemaan. Lisäksi vapaat hydroksyyliiryhmät 3- ja 7-asemissa tehostivat organokatalyytin toimintaa.⁶⁰



Kuva 31. Koolihapon ja proliinin konjugaatti, jossa proliini on liitetty koolihapon 7- tai 12-asemiin.⁶⁰



Kuva 32. Sappihappopohjaisen organokatalyytin käyttö 4-nitrobensaldehydin (**104**) ja asetonin (**105**) aldolreaktiossa.⁶⁰

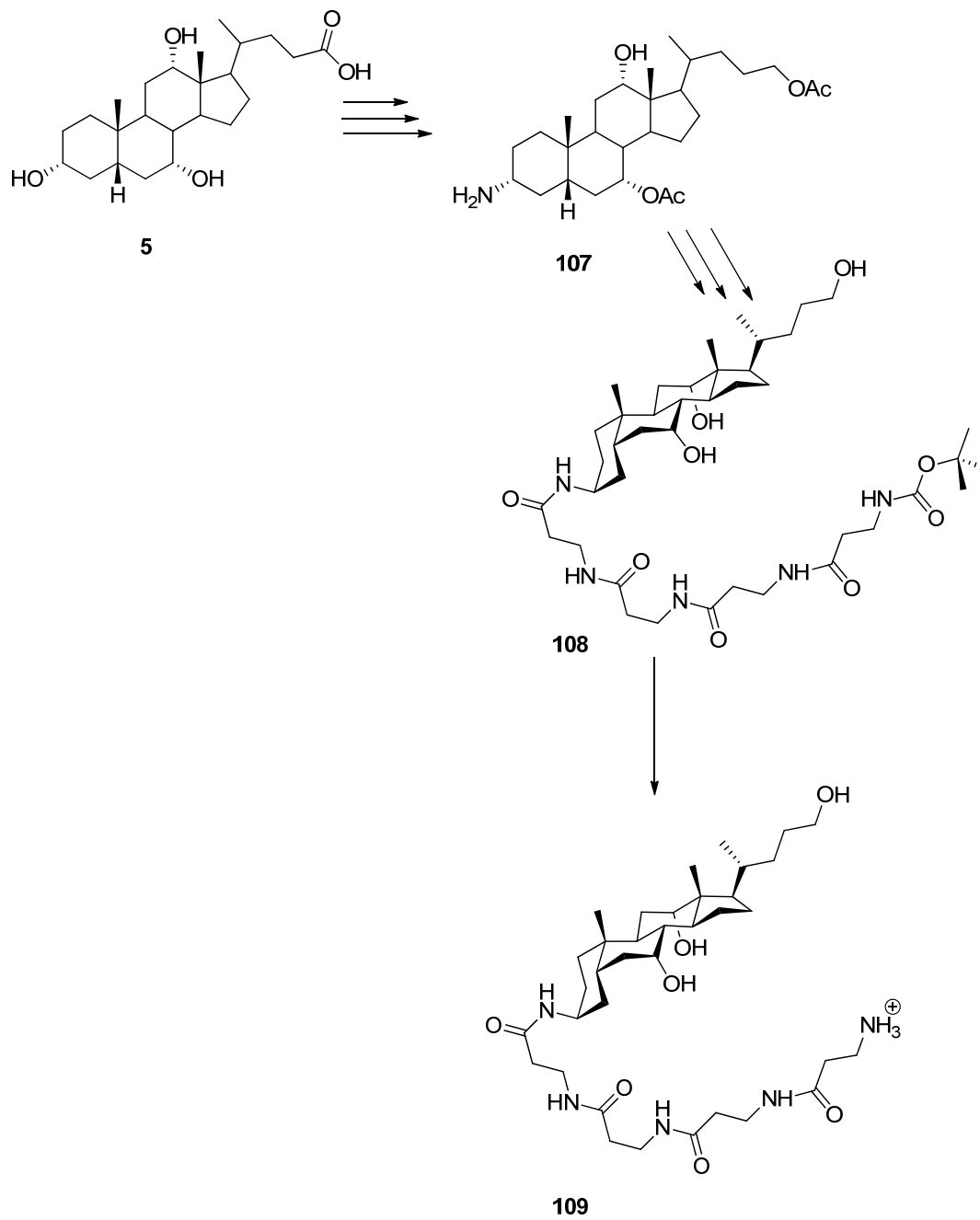
5 SAPPIHAPPOJEN OLIGOPEPTIDIKONJUGAATIT

Farmakologisesti aktiivisten oligopeptidien ongelmana ovat niitä ruoansulatuskanavassa pilkkovat peptidaasit. Oligopeptidien konjugoinnin johonkin kantajamolekyyliin, esim. sappihappoon, on havaittu lisäävän niiden pysyvyyttä. Lisäksi niiden imeytyminen ohutsuolesta tehostuu kantajamolekyyliin kuljetusmekanismien aktiivisen toiminnan seuraamuksena. Sappihappo-oligopeptidikonjugaatit voivat myös toimia erilaisina polyfunktionaalisina rakenteina, joita tarvitaan mm. kombinatorisissa molekyylikirjastoissa, glykoklustereissa ja podandityyppisissä synteettisissä reseptoreissa. Sappihappojen oligopeptidikonjugaattien eniten tutkittu ryhmä ovat farmakologiset sovellukset, mutta konjugaateilla on mahdollista käyttöä myös supramolekyylikemiassa.

5.1 Sappihappojen oligopeptidikonjugaatit farmakologisissa sovelluksissa

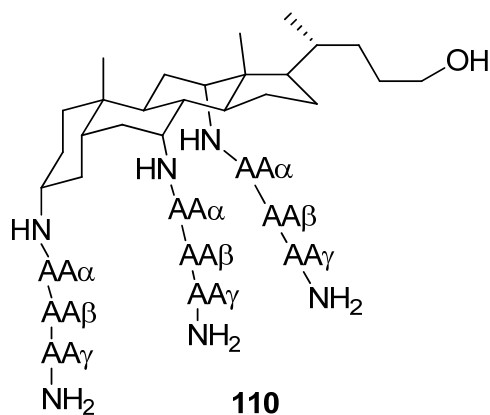
Mikrobien lääkeaineresistenssin kehittyminen on noussut merkittäväksi ongelmaksi viime vuosina. Sappihappojen ja niiden johdannaisten sytotoksisia ominaisuuksia on tutkittu 1950-luvulta lähtien. Vapaiden sappihappojen on todettu toimivan heikkoina antimikrobisina aineina; ne mm. tehostavat joidenkin mikrobien kykyä ottaa vastaan antibiootteja, kuten gentamysiiniä.⁵⁸

Hazra *et al.* ovat valmistaneet koolihaposta ja glysiinistä sekä β -alaniinista tetrapeptidikonjugaatteja (109, kuva 33), joiden aktiivisuutta useita eri mikro-organismeja (Gram-positiiviset ja Gram-negatiiviset bakteerit sekä sienet) vastaan testattiin. Lisäksi yhdisteiden sytotoksisuutta tutkittiin HEK293 (*human embryonic kidney carcinoma*)- ja MCF-7 (*human mammary adenocarcinoma*)-soluvielmillä. Valmistettujen yhdisteiden itsessään todettiin olevan suhteellisen inaktiivisia, mutta vaikuttavan synergisesti eri antibioottien, kuten flukonatsolin ja erytromysiinin, kanssa.⁶¹



Kuva 33. Koolihaposta ja L-alaniinista valmistettu tetrapeptidikonjugaatti (**109**).⁶¹

Savage *et al.* ovat valmistaneet ja tutkineet kationisia steroidiantibiootteja (CSA). Kationiset steroidiantibiootit kehiteltiin matkimaan sisäsyntyisten peptidiantibioottien toimintaa. Ryhmä valmisti koolihapon triaminoanalogeja, joihin konjugoitiin aminohapoista muodostettuja tripeptidejä. Aminohappoina käytettiin histidiiniä, lysiiniä, metioniiniä, fenyylialaniinia, tryptofaania ja valiinia (kuva 34). Nämä aminohapot valittiin, koska emäksisten aminohappojen (lysiini, histidiini) tiedetään lisäävän molekyylin amfiifilisyyttä, kun taas aromaattiset aminohapot (fenyylialaniini, tryptofaani) sekä hydrofobiset aminohapot (metioniini ja valiini) vuorovaikuttavat bakteerisolujen solukalvojen poolittomien komponenttien kanssa.⁶²



AA= histidiini, lysiini, metioniini, fenyylialaniini, tryptofaani tai valiini

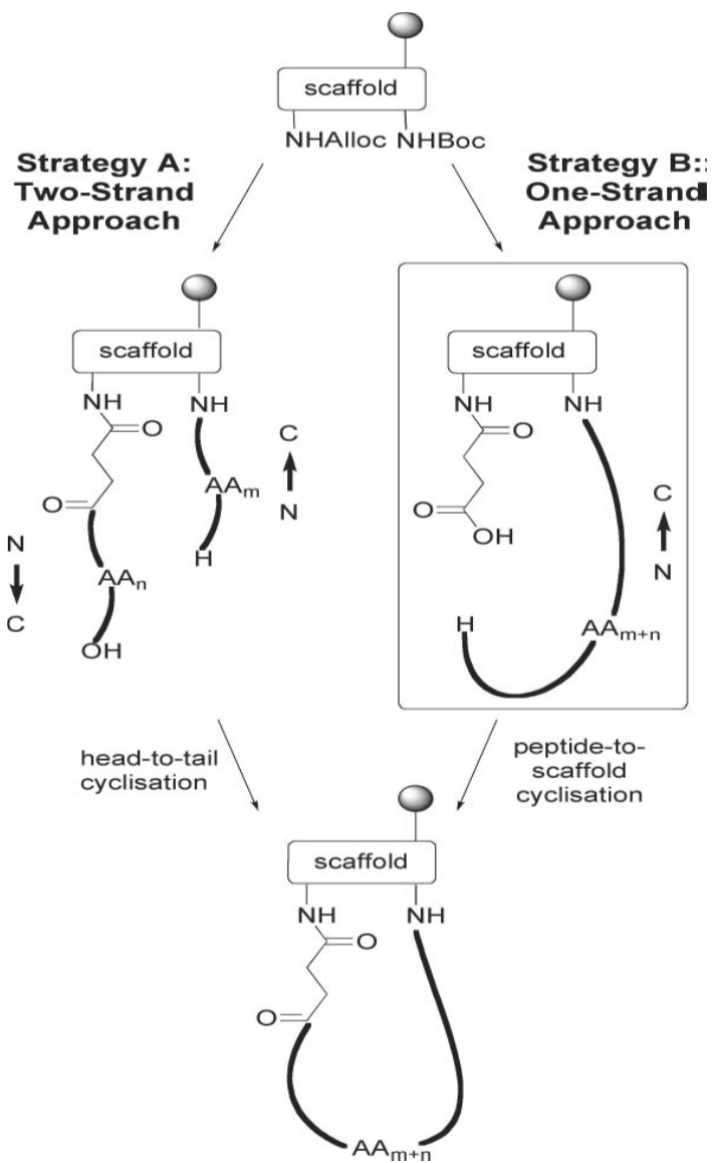
Kuva 34. Kaavakuva CSA-tripeptidikonjugaatista.⁶²

Valmistettujen yhdisteiden antibakteerista aktiivisuutta Gram-negatiivisia (*Escherichia coli*) ja Gram-positiivisia (*Staphylococcus aureus*) bakteereita vastaan tutkittiin. Tutkimuksessa todettiin kationisten tripeptidi-steroidiantibioottikonjugaattien olevan tehokkaita antibakteerisia aineita. Lisäksi havaittiin, että tripeptidiketju oli riittävän lyhyt, jotta antibakteeriselle aktiivisuudelle välttämätön morfologia säilyi.

Plasmidi-DNA:n (pDNA) siirtymisen soluun on todettu olevan sekä *in vivo*- että *in vitro*-tutkimuksissa hidasta. Kish *et al.* ovatkin valmistaneet kenodeoksikoolihapon ja oligoarginiinin konjugaatteja (BAC), joiden on todettu muodostavan komplekseja pDNA:n kanssa. Kompleksinmuodostus perustuu tutkimusryhmän mukaan elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin nukleiinihapon negatiivisesti varautuneen fosfaattiryhmän ja positiivises-

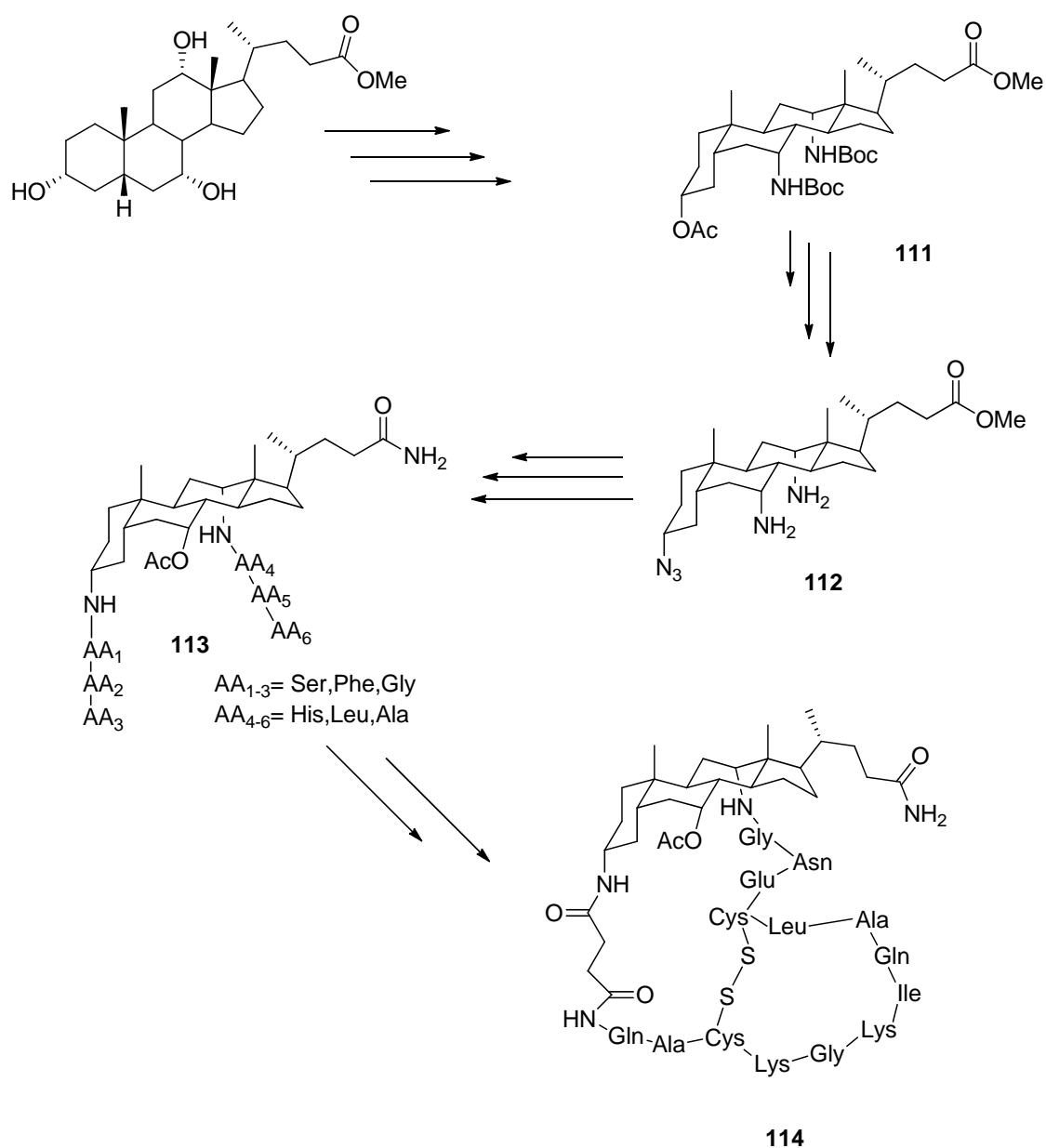
ti varautuneen oligoarginiinin välillä. Tutkimusryhmä on tarkastellut vuorovaikutuksia valmistamalla 13 erilaista BAC-konjugaattia liittämällä sappihapon 24-asemaan kolmesta kolmeentoista arginiinimolekyyliä. Yhdisteiden vuorovaikutusta rengasmaisen plasmidi-DNA:n kanssa on tutkittu käyttäen fluoresoivaa värjäystä ja läpäisyelektronimikroskopiaa (TEM) sekä tekemällä *in vitro* -tutkimuksia liposomeissa. Kontrolliaineenä käytettiin kaupallista Lipofectamiinia. Tutkimuksissa todettiin, että BAC:t toimivat kontrolliainetta tehokkaampina DNA:a sitovina lipopolyamiinipohjaisina vektoreina tai molekyylikoettimina.⁶³

Madder *et al.* ovat tutkineet 14 aminohapon muodostaman silmukan konjugointia koolihappoon kahdella eri menetelmällä; käyttäen kahden erillisen peptidiketjun head-to-tail-liittämistä toisiinsa tai liittämällä valmiin peptidiketjun sappihapporunkoon (kuva 35). Kahden erillisen peptidiketjun head-to-tail-menetelmässä riskinä on epimerisoituminen. Sen välttämiseksi kehitellyssä menetelmässä valmistettiin ensin peptidiketju, joka liitettiin valmiina sappihapon 3-asemaan käyttäen meripihkahappoa välikkeenä.⁶⁴



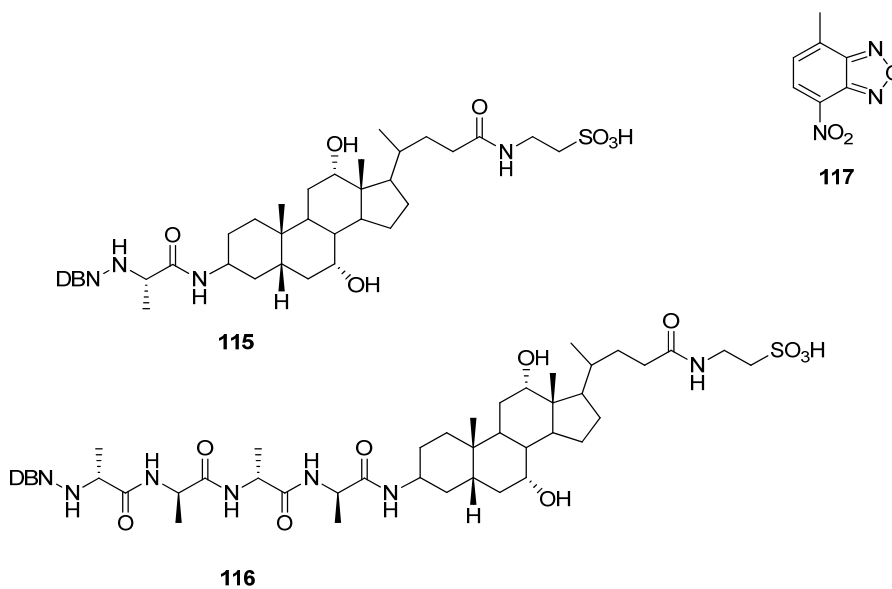
Kuva 35. Syklinen peptidisteroidi, jossa on käytetty joko kahden erillisen peptidiketjun (A) tai yhden peptidiketjun (B) menetelmää.⁶⁴

Edellä kuvattua rakennetta on kehitetty eteenpäin valmistettaessa pitkistä peptidiketjuis- ta muodostuvaa monimutkaisempaa silmukkarakennetta (kuva 36). Valmistetun sil- mukkarakenteisen yhdisteen havaittiin olevan pysyvämpi verrattuna suoraketjuiseen rakenteeseen. Lisäksi yhdisteen sitoutumisen tuhkarokkoviruksen HNE:n (*hemagglutinin noose epitope*) monoklonaalisiin vasta-aineisiin havaittiin tehostuvan. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää esimerkiksi kehiteltäessä tuhkarokkorokotetta.⁶⁵



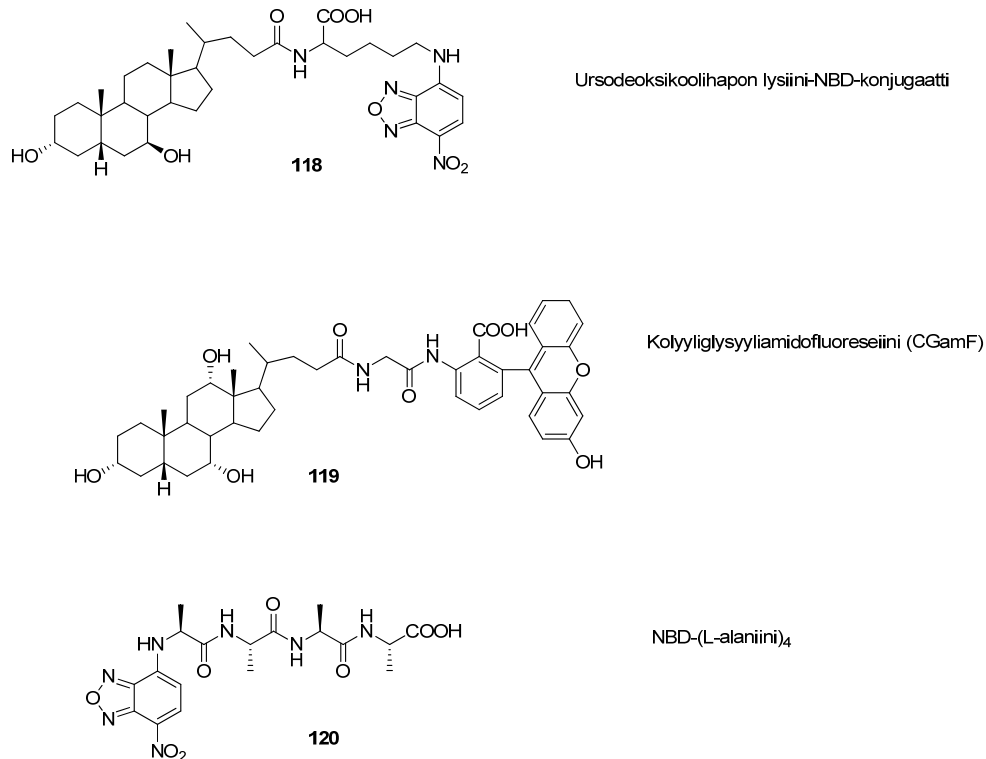
Kuva 36. Silmukkarakenteen, jota voidaan käyttää mm. rokotteissa, valmistus.⁶⁵

Petzinger *et al.* ovat tutkineet L-alaniinin ja siitä valmistetun tetrapeptidin (L-(ala)₄) sappihappokonjugaattien kulkeutumista maksaan (kuva 37). Molekyylit liitettiin taurokolaatin 3-asemaan. Yhdisteiden erittymistä sappeen seurattiin fluoresoivan 4-nitrobenso-2-oksa-1,3-diatsoolin (NBD) avulla.⁶⁶



Kuva 37. Taurokolaatin L-ala (**115**) ja L-(ala)₄ (**116**) -konjugaatit, joissa on tunnistusta varten NBD-osa (**117**).⁶⁶

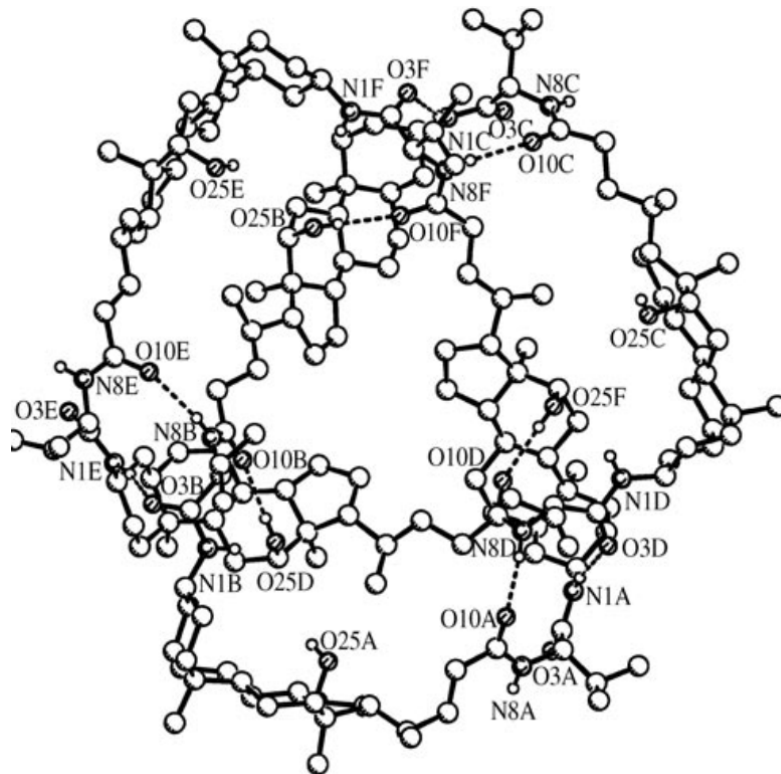
Rotilla tehdyissä maksan läpivirtauskokeissa todettiin, että yhdistettä, jossa yksi L-alaniini on liitetty taurokolaattiin, proteiinit kuljettivat luonnollisiin sappihappoihin verrattavalla mekanismilla. Se kulkeutui maksaan jopa nopeammin kuin pelkkä taurokolaatti. Tulos on yhtenevä aiemmissa tutkimuksissa^{66,67} havaittujen seikkojen kanssa: Sappihappojen 3-aseman hydroksyyli-ryhmä ei ole välttämätön ASBT:n ja NTCP:n toimesta tapahtuvassa molekyyliintunnistuksessa ja sappihapot, joista puuttuu hydroksyyli-ryhmä asemasta 3, kulkeutuvat maksa- ja suolisoluihin nopeammin kuin pelkkä taurokolaatti. Tetrapeptidi (L-(ala)₄)-taurokolaattikonjugaatti imeytyi sekä suolistossa että maksassa huomattavasti tehokkaammin kuin pelkkä vastaava peptidi. Tulokset viittaavat siihen, että suolistossa Asbt ja maksassa Oatp1 kuljettavat näitä yhdisteitä. Merkittävä havainto oli, että tetrapeptidikonjugaatti säilyi muuttumattomana läpivirtauksen ajan. Tarkasteltaessa yhdisteitä, joissa fluoresoiva leima oli 24-asemassa (kuva 38), havaittiin ursodeoksikoolihapon lysiini-NBD-konjugaatin (**118**) kulkeutuvan huonosti ohutsuoleen alentaen sapen virtausta ja sappinesteen tilavuutta. Koolihaposta valmistettu kolyyliglysyliamidofluoreseiini (CGamF) -yhdiste (**119**) puolestaan oli kulkeutumisenopeudeltaan läpivirtauskokeissa kaikista tutkituista molekyyleistä kolmanneksi nopein. Vertailumolekyylinä käytetty sappihappoa sisältämätön NBD-(L-ala)₄ - johdannainen (**120**) hajosi tutkimuksen aikana, eikä sen kulkeutumista voitu sen vuoksi tarkastella. Tutkimustulosten perusteella konjugointi sappihappoihin voi tehostaa pienten peptidien kuljetusta.^{66,67}



Kuva 38. Valmistetut yhdisteet, joihin kulkeutumisen seuraamista varten liitetty fluoresoiva leima on 24-asemassa.⁶⁶

5.2 Sappihappojen oligopeptidikonjugaatit supramolekyylisäätelyssä

Feigel tutkimusryhmineen on havainnut, että lineaariset oligoamidit voivat muodostaa kierteisiä tai nauhamaisia ketjuja, jotka muodostavat isompia solmumaisia makrosyklisiä rakenteita. Deoksikoolihapon L-valiiniinikonjugaatin röntgenrakennetta tutkittaessa havaittiin yhdisteen muistuttavan apilamaista solmua. Solmu muodostaa kulhomaisen rakenteen, jonka sisäpuoli on pooliton ja ulkopuoli poolinen (kuva 39).⁶⁸ Solmurakenteita on tutkittu mm. molekyylikatkaisimina, joissa niiden säätelyyn voidaan käyttää ulkopuolista ärsykettä kuten esim. valoa tai kemiallista tai elektrokemiallista palautetta. Lisäksi niistä voidaan rakentaa nanokokoisia makrosyklejä, joissa solmut eivät ole vain kovalenttisesti muodostuneita, vaan rakenteen muodostuminen edellyttää myös solmurakenteiden kietoutumista toisiinsa osana systeemiä.^{69,70}



Kuva 39. Deoksikoolihapon valiinikonjugaatin Schakal-piirros, jossa näkyy apilamainen rakenne.⁶⁸

6 YHTEENVETO

Sappihappojen aminohappokonjugaatteja on tutkittu useiden vuosikymmenten ajan. Sappihapot ovat steroidirunkoisia maksassa entsyymaattisesti muodostuvia kolesterolin aineenvaihduntatuotteita. Sappihapot esiintyvät yleensä vesiliukoisina glysiini- tai tauriini-konjugaatteina, jollaisina ne varastoituvat sappirakkoon. Sieltä ne vapautuvat ruokailun yhteydessä ruoansulatuskanavaan. Sappihappoja tarvitaan rasvojen ja rasvaliukoisten vitamiinien imeytymiseen. Sappihapot ovat ominaisuuksiltaan monipuolisia, ja niiden konjugointi aminohappojen tai oligopeptidien kanssa laajentaa käyttömahdollisuuksia huomattavasti.

Sappihappojen aminohappokonjugaatteja on käytetty mm. molekyyli-lisateenvarjoina. Molekyyli-lisateenvarjot kehiteltiin alkujaan paitsi tehostamaan hydrofiilisen lääkeaineen kuljetusta hydrofobisten kalvojen läpi, myös parantamaan lääkeaineen vesiliukoisuutta ja tiettyjen hydrofobisten lääkeaineiden hydrolyyttistä kestävyyttä. Sappihappo-aminohappoanalogeja on tutkittu myös ionikuljettimina, reseptoreina ja gelaattoreina. Supramolekulaariset gelaattorimolekyylit itsejärjestäytyvät ei-kovalenttisten vuorovaikutusten avulla verkkomaisiksi rakenteiksi, jotka sitovat nesteen rakenteisiinsa. Geelejä käytetään mm. useissa farmakologisissa sovelluksissa, kuten lääkeaineiden kuljetuksessa sekä aihiolääkkeissä. Lääketieteellisten sovellusten lisäksi geelejä käytetään useissa jokapäiväisissä tuotteissa, kuten piilolinseissä, hiusgeeleissä ja elintarvikkeissa. Edellä mainittujen käyttötarkoitusten lisäksi sappihappo-aminohappokonjugaatteja on käytetty kultananopartikkelien valmistuksessa sekä reaktion enantioselektiivisyyttä edesauttavina katalyytteinä.

Suurinta mielenkiintoa on herättänyt konjugaattien käyttö farmakologisissa sovelluksissa. Perinteisesti lääkeaineiden ominaisuuksia on yritetty parantaa tekemällä niistä synteettisiä johdoksia, joilla olisi alkuperäiseen lääkeaineeseen verrattuna paremmat fysiokemialliset ominaisuudet. Aihiolääkkeet, joista käytetään myös nimitystä *prodrug*, ovat lääkeaineen farmakologisesti inaktiivisia johdoksia, joista lääkeaine vapautuu kontrolloidusti elimistössä joko kemiallisen tai entsyymaattisen reaktion kautta. Ehkäpä tunnetuin sappihappo-aminohappopohjainen aihiolääke on deoksikolyylivalyylisikloviiri, joka parantaa herpes-viruksen kasvua inhiboivan asikloviirin biosaatavuutta.

Aihiolääkkeiden lisäksi sappihappo-aminohappo-analogeja on tutkittu mm. syöpälääkkeinä, jossa *cis*-platinan konjugointi sappihappoon tehosti lääkeaineen sytostaattisia ominaisuuksia sekä paransi kohdentamista haluttuun kudokseen tai elimeen. Muita farmakologisia sovelluksia ovat mm. mikrobilääkkeet ja magneettiresonanssikuvauksen (MRI) varjoaineet.

Sappihappo-oligopeptidikonjugaatteja käytetään mm. farmakologisissa sovelluksissa, joissa pitkistä peptidiketjuista muodostuvia rakenteita voidaan käyttää kehiteltäessä esim. rokotteita.

KOKEELLINEN OSA**Sappihappojen aminoetyyliamidien ja L-proliinin konjugaattien
valmistus**

7 TYÖN TARKOITUS

Sappihapot ovat maksassa muodostuvia steroidirunkoisia kolesterolin aineenvaihduntatuotteita, jotka sisältävät syklopentanofenantreenirungon ja 3–9 hiiliatomista muodostuneen sivuketjun, joka päättyy karboksyylihapporyhmään. Yleisimmät sappihapot ovat 24 hiiltä sisältävän kolaanihapon johdannaisia. Sappihapoilla on merkittävä rooli ruoansulatuksessa rasvojen ja rasvaliukoisten vitamiinien imeytymisessä elimistöön.⁷¹

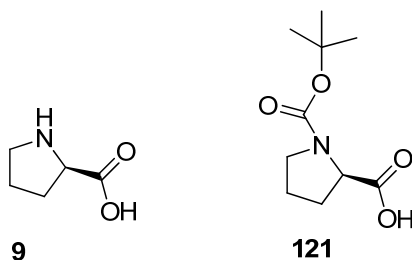
Sappihapot jaotellaan primäärisiin ja sekundäärisiin sappihappoihin. Primäärisiä, maksassa biosyntetisoituja sappihappoja ovat kenodeoksikoolihappo ($3\alpha,7\alpha$ -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo) ja koolihappo ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroksi-5 β -kolaani-24-happo). Näistä suolistobakteerien toiminnan avulla muodostuvat sekundääriset sappihapot litokoolihappo (3α -hydroksi-5 β -kolaani-24-happo) ja deoksikoolihappo ($3\alpha,12\alpha$ -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo). Näiden lisäksi farmakologiassa käytetään synteettistä ursodeoksikoolihappoa ($3\alpha,7\beta$ -dihydroksi-5 β -kolaani-24-happo), jota luonnossa esiintyy vain karhun sapessa.⁴

Sappihapoilla on jäykkä, kovera runko ja poolinen sivuketju. Steroidirungon hydroksyyli-ryhmiä voidaan esteröidä, hapettaa, eetteröidä, pelkistää tai muuttaa aminoryhmiksi. Sivuketjun 24-asemassa oleva happoryhmä voidaan puolestaan esimerkiksi esteröidä, amidoida tai muuttaa anhydridiksi. Koska sappihapot ovat helposti saatavia ja suhteellisen edullisia, niitä käytetään mm. supramolekyyliekemiassa. Sappihappoja ja niiden johdannaisia tutkitaan mahdollisina vaihtoehtoina lääkeaineiden spesifisessä kuljetuksessa ja annostelussa.

L-Proliini (Pro) eli 2-pyrrolidiinikarboksyylihappo on yksi kahdestakymmenestä DNA:n koodaamasta aminohaposta. Sen rakenne esitetään kuvassa 40. Se on ei-välttämätön aminohappo, jota elimistömme osaa valmistaa biosynteettisesti glutamaatista, joka on glutamiinihapon suola tai esteri. Proliinin rakenne on syklinen eli rengasmainen. Rengas ei kuitenkaan ole aromaattinen vaan alisyklinen. Rengas muodostaa hydrofobisen sivuketjun, joka rajoittaa molekyylin taipuisuutta N-C α -sidoksen ympäri. Jäykän rakenteensa vuoksi proliini on usein aminohappoketjun päässä tai kahden α -kierteen käännekohdassa. Proliini on tärkeä osa kollageenia, jossa se esiintyy hydroksiproliinina, ja sitä

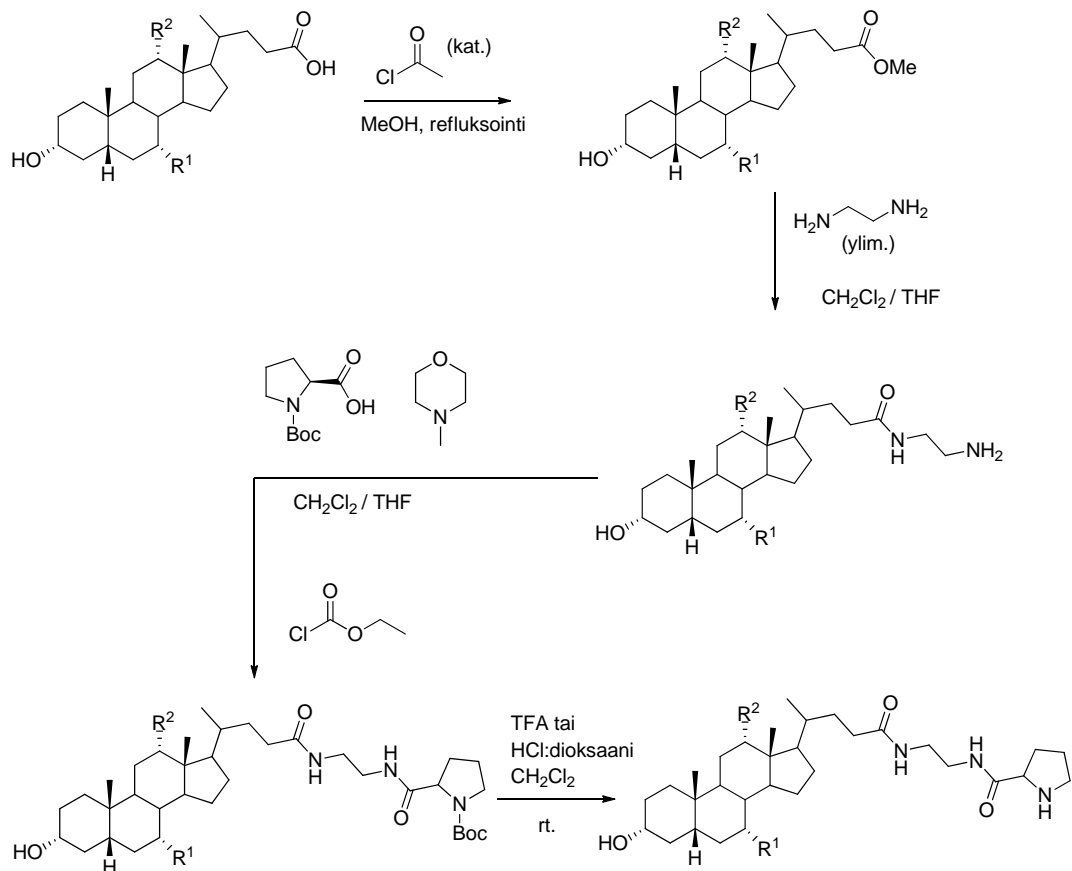
tarvitaan nivelsiteiden ja jänteiden toimintaan. Lisäksi proliinia esiintyy ihossa ja verisuonten seinämissä.^{4,7,9}

Tässä työssä käytettiin *tert*-butyylioksidikarbamaatti- eli Boc-suojattua proliinia. Suojaryhmä on sitoutunut aminoryhmään kovalenttisella sidoksella, ja sen tarkoitus on ehkäistä aminoryhmän toimiminen nukleofiilina. Yleensä suojaryhmänä toimii karbamaatti, ja Boc-suojauksen lisäksi aminoryhmän suojaukseen voidaan käyttää mm. bentsoyloksikarbonyyli (Cbz)- tai 9-(fluorenyylimetyylioksi)karbonyyli (Fmoc)-suojausta. Kullakin suojaryhmällä on omat poistomenetelmänsä.¹²



Kuva 40. L-Proliini (**9**) ja sen Boc-suojattu muoto (**121**).

Erikoistyön tarkoituksena oli valmistaa sappihappojen aminoetyyliamidien ja Boc-suojatun L-proliinin konjugaatteja sekä tutkia niiden geelinmuodostusominaisuuksia. Sappihappoina käytettiin litokoolihappoa LCA (**1**), kenodeoksikoolihappoa CDCA (**2**), deoksikoolihappoa DCA (**3**) ja koolihappoa CA (**4**). Työn kokeellisessa osassa käytettyjen sappihappojen rakenteet esitetään tämän tutkielman alussa sivulla 4. Erikoistyössä valmistettiin ensin sappihapon metyyliesteri, johon konjugoitiin etyleenidiamiini amidisidoksella. Näin saatuun sappihapon 2-aminoetyyliamidiin liitettiin Boc-suojattu proliini. Erikoistyön lopussa valmistetuista tuotteista poistettiin Boc-suojaus. Synteesireitti esitetään kaaviossa 1. Boc-proliinin konjugoinnin suunnittelussa käytettiin kirjallisuudessa esitettyä synteesimenetelmää.⁶⁰



Kaavio 1. Synteesireitti ja käytetyt olosuhteet sappihappojen L-proliinijohdannaisten valmistukseen.

8 MENETELMÄT, LAITTEET JA KÄYTETYT REAGENSIT

8.1 Menetelmät ja laitteet

Synteseissä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 2. Ohutlevyinä käytettiin Merckin Silica gel 60 F 254 -ohutlevyjä (koko 20 x 20 cm) sekä Macherey-Nagelin Alugram Sil G/UV 254-ohutlevyjä (koko 20 x 20 cm). Pylväskromatografiassa käytettiin Merckin Silica gel 60 -geeliä, jonka partikkelikoko oli 0,040–0,063 mm.

Synteesituotteista mitattiin ^1H NMR -spektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osaston Bruker Avance DPX 250 NMR -spektrometrillä. Joistakin tuotteista mitattiin spektrit käyttäen Bruker Avance DRX 500 NMR -spektrometriä. Osasta tuotteita mitattiin myös ^{13}C NMR -spektri sekä ^{13}C DEPT-135-, PFG ^1H , ^{13}C HMQC- sekä PFG ^1H , ^{13}C HMBC NMR -spektrit Bruker Avance DRX 500 NMR -spektrometrillä.

^1H NMR -mittauksissa kemiallisen siirtymän arvoja verrattiin deuteroitujen liuottimien signaaleihin δ (CHCl_3) = 7,26 ppm ja δ (MeOH) = 3.31 ppm. ^{13}C NMR-mittauksissa kemiallisen siirtymän arvoja verrattiin liuottimien signaaliin δ (CHCl_3) = 77,00 ppm ja δ (MeOH) = 49,1 ppm. Molemmissa mittauksissa sisäisenä standardina oli tetrametyylisilaani. Synteesituotteista mitattiin myös massaspektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osaston Micromass LCT ESI TOF -massaspektrometrillä. Saatuja spektrejä verrattiin internetin SDBS-tietokantaan,⁷² kirjallisuusarvoihin⁷³ sekä mitattuihin mallispektreihin. Lopputuotteille tehtiin myös alkuaineanalyysit. Kolmelle lopputuotteelle tehtiin lisäksi geelinmuodostuskokeet käyttäen yhteensä 36 eri liuotinta (taulukko 3).

8.2 Käytetyt reagenssit, niiden puhtaus sekä valmistajat

Synteseissä käytetyt metyyliimorfoliini, etyyliklooriformiaatti sekä isobutyliklooriformiaatti tislattiin ennen käyttöä. Liuottimena käytetty dikloorimetaani kuivattiin 4 Å-seuloilla ja THF oli kuivattu MBraun Solvent Purification System -laitteella.

Taulukko 2. Synteeseissä käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Puhtaus	Valmistaja
4-Metyylimorfoliini	99 %	Acros
Asetonitrili	HPLC	Sigma
Asetylikloridi	98 %	-
Deoksikoolihappo	98,5 %	Acros
Dikloorimetaani	98 %	Fluka
Etyleenidiamiini	100 %	J.T. Baker
Etyyliklooriformiaatti	97 %	Merck
Heksaani	-	-
Hiilitetrakloridi	99,9 %	J.T. Baker
Isobutyliklooriformiaatti	98 %	Aldrich
Kenodeoksikoolihappo	95 %	Sigma
Kloroformi	-	BDH Prolabo
Koolihappo	97 %	Sigma
Litokoolihappo	97 %	Aldrich
Metanoli	p.a	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -Boc-proliini	99 %	Aldrich
Tetrahydrofuraani	99,5 %	Fluka
Tolueeni	99,5 %	BOH Analar
Trifluoretikkahappo	99 %	Merck

Taulukko 3. Geelinmuodostuskokeissa käytetyt liuottimet.

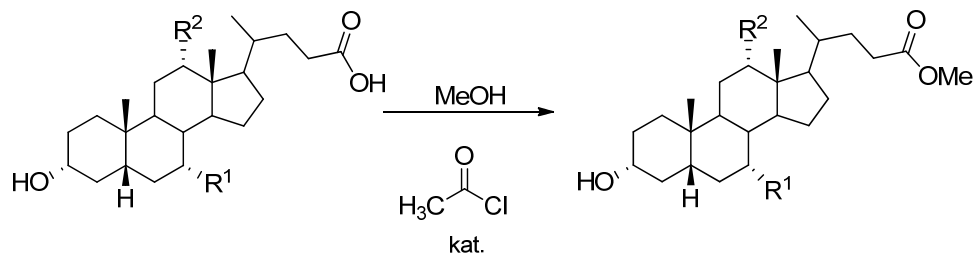
Liuotin	Puhtaus	Valmistaja
Bentseeni	99,9 %	VWR
Tolueeni	99,5 %	BOH Analar
Etyylibentseeni	99,0 %	Aldrich
<i>o</i> -Ksyleeni	99,0 %	Fluka
<i>m</i> -Ksyleeni	99,0 %	Aldrich
<i>p</i> -Ksyleeni	99 %	Aldrich
Mesityleeni	99 %	Aldrich

<i>tert</i> -Butyylibentseeni	99 %	Aldrich
Kumeeni	98 %	Fluka
Klooribentseeni	99 %	Acros Organics
Anisoli	99,5 %	Riedel de Hæn
Asetonitriili	HPLC	VWR
Dikloorimetaani	99,9 %	Sigma-Aldrich
Tetrakloorimetaani	99,9 %	J.T. Baker
Asetoni	99,5 %	Sigma-Aldrich
Etyyliasettaatti	99,5 %	Sigma-Aldrich
1-Pentanoli	99,0 %	Fluka
1,4-Dioksaani	Analytical	BDH Prolabo
2-Propanoli	-	Kebolab
1-Butanoli	99,5 %	BDH Prolabo
1-Oktanoli	>99 %	Merck
Sykloheksanoli	99 %	Riedel de Hæn
<i>n</i> -Heksaani	-	Rathburn
Dietylietteri	99,5 %	VWR
Tetrahydrofuraani	99,7 %	BDH Prolabo
<i>N,N</i> -Dimetyyliformamidi	99,8 %	LabScan
Kloroformi	-	BDH Prolabo
Pyridiini	99,7 %	BDH Prolabo
Dimetyylisulfoksidi	99,0 %	Fluka
Etikkahappo	100 %	BDH Prolabo
Metanoli	p.a	Sigma-Aldrich
Muurahaishappo	98 %	Fluka
Formamidi	99 %	Merck
Vesi, ionivaihde	-	-
Etyleeniglykoli	99,5 %	Riedel de Hæn
Syklohekseeni	-	-

9 SYNTEESIT PÄÄPIIRTEITTÄIN

Tässä kappaleessa esitellään erikoistyön aikana tehdyt synteesit pääpiirteissään. Tarkat synteesiohjeet löytyvät kappaleesta 12.

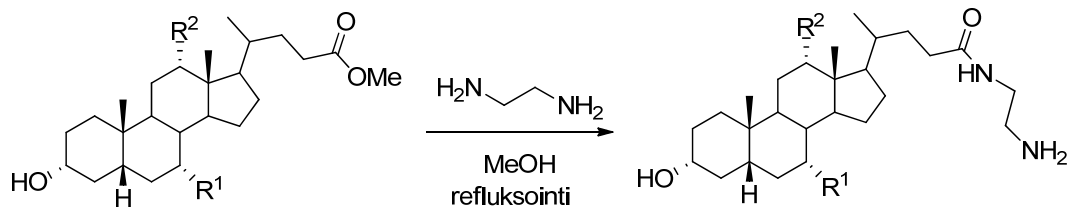
9.1 Yleisohje sappihapon metyyliesterien valmistukseen (122, 123, 124, 125)



	R¹	R²
122	H	H
123	OH	H
124	H	OH
125	OH	OH

Synteesi suoritettiin litokooli-, deoksikooli-, kenodeoksikooli- ja koolihapoilla. Sappihappo liuotettiin metanoliin ja seokseen lisättiin muutama pisara asetylikloridia. Reaktioseosta refluksottiin öljyhautella yön yli, jonka jälkeen reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Tämän jälkeen reaktioseos haihdutettiin mahdollisimman kuivaksi. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Tarvittaessa tuotetta kuivattiin vakuuminlinjassa.

9.2 Yleisohje sappihapon 2-aminoetyyliamidien valmistukseen (126, 127, 128, 129)



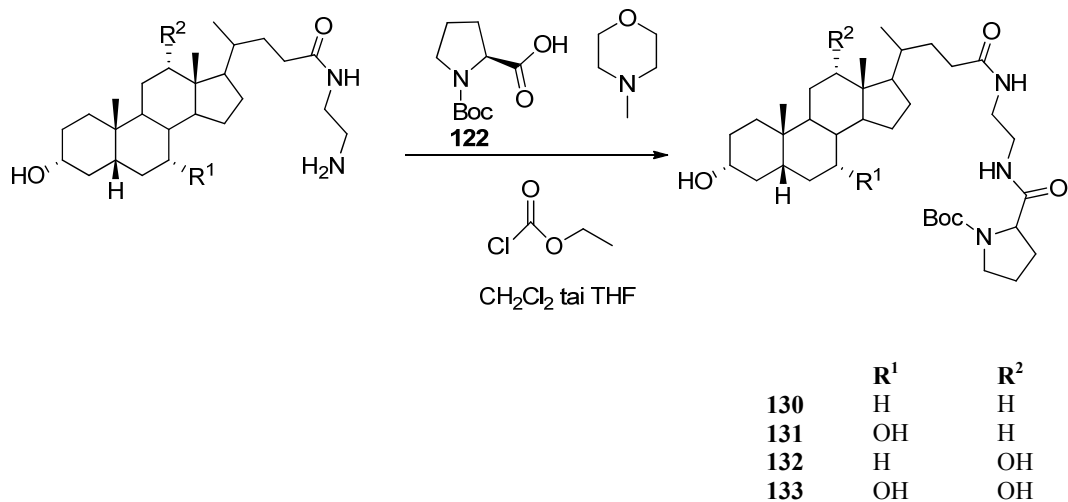
	R ¹	R ²
126	H	H
127	OH	H
128	H	OH
129	OH	OH

Edellä valmistetuista sappihapon metyyliestereistä valmistettiin vastaavat sappihapon 2-aminoetyyliamidit. Litokooli- ja deoksikoolihappojen amidit pystyttiin saostamaan jäävedestä, mutta kenodeoksikooli- ja koolihappojohdannaisia ei voitu hydrofiilisyytensä vuoksi käsitellä samoin, vaan ne vaativat oman menettelynsä.

Litokooli- ja deoksikoolihapon kohdalla aiemmin valmistettu sappihapon metyyliesteri liuotettiin metanoliin ja reaktioseokseen lisättiin 20–30-kertainen ylimäärä etyleeni-amiinia. Reaktioseosta refluksottiin öljyhauteella vähintään kaksi vuorokautta. Tämän jälkeen liuottimesta haihdutettiin noin puolet pois ja loput reaktioseoksesta kaadettiin jääveteen. Muodostunutta sakkaa pestiin jäävedellä, kunnes suodos oli väritöntä, ja tämän jälkeen suodatettiin imulla. Sakan puhtaus tarkastettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Tarvittaessa tuotetta kuivattiin vakuuminlinjassa.

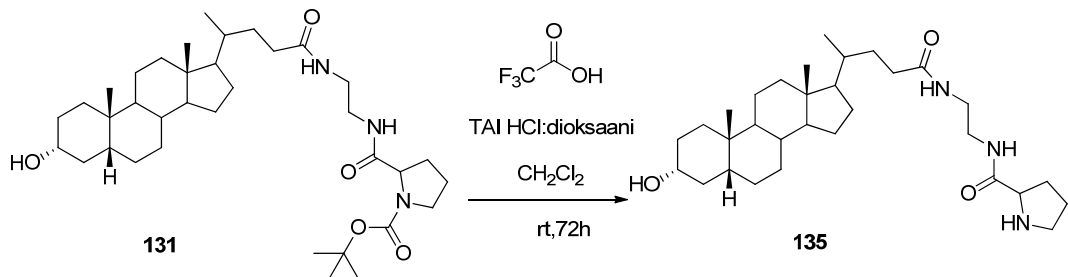
Kenodeoksikooli- ja koolihapon tapauksessa synteesi suoritettiin kuten edellä. Refluksoinnin jälkeen liuottimesta haihdutettiin noin puolet pois, minkä jälkeen lisättiin toluenia ja haihdutettiin liuotin pois. Tämä toistettiin kaksi kertaa. Tämän jälkeen raaka- tuotteeseen lisättiin jäävettä ja metanolia ja haihdutettiin jälleen. Kun vesi-metanoliseos oli saatu haihdutettua, lisättiin metanoli-asetonitriili-seosta (1:1) ja haihdutettiin. Tämä käsittelysarja toistettiin jäävesi-metanoli-pesusta lähtien. Tuotteen puhtaus tarkastettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla ja tuotetta kuivattiin tarvittaessa vakuumissa.

9.3 Yleisohje L-Boc-proliinin konjugointiin (130, 131, 132, 133)



Sappihapon aminoetyyliamidiin konjugoitiin Boc-suojattu L-proliini **121**. Reaktiossa emäksenä käytettiin *N*-metyylimorfoliinia ja Boc-proliini aktivoitiin käyttämällä etyyli-klooriformiaattia. Tarkoituksena oli käyttää liuottimena dikloorimetaania, mutta liukoisuusongelmien vuoksi kokeiltiin myös tetrahydrofuraania. Synteesi tehtiin N₂-atmosfäärissä huoneenlämmössä. Raakatuotetta pestiin erotussuppilossa laimealla (0,1 M) HCl-liuoksella sekä kylläisillä NaHCO₃- ja NaCl-liuoksilla, kuivattiin, suodatettiin ja haihdutettiin. Tuote puhdistettiin pylväskromatografialla. Tuotteen puhtaus varmistettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla.

9.4 Yleisohje Boc-suojauksen poistoon (134)



Valmistetusta litokoolihapon aminoetyyliamidin ja Boc-proliinin konjugaatista (**130**) yritettiin poistaa suojausryhmä kolmesti käyttäen kahta eri menetelmää.^{74,75} Kahdesti käytettiin trifluoretikkahappoa (TFA) ja kolmannella kerralla kokeiltiin HCl-dioksaanikäsittelyä. Boc-suojatun tuotteen annettiin reagoida trifluoretikkahapon (TFA) tai HCl:dioksaanin kanssa huoneenlämmössä. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti

10 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

10.1 Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (**122**)

Tuotetta **122** valmistettiin kerran. Saanto (5.57 g) oli 96 % teoreettisesta saannosta. Tuotteen muodostumista ja puhtautta arvioitiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Spekt-rissä havaittiin metyyliesterin metoksiyhmälle tyypillinen signaali kemiallisen siirtymän arvolla 3,65 ppm. Signaalin integraalin olisi pitänyt olla lähellä kolmea, mutta samalla ppm-alueella havaittiin myös liuottimena käytetyn metanolin signaali. Signaalien osittaisen päällekkäisyyden vuoksi integrointia ei voitu tehdä luotettavasti. Tästä huolimatta reaktion todettiin onnistuneen. Tuotetta kuivattiin vakuumissa liuotinjäämien haihduttamiseksi.

10.2 Metyyli-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (**123**)

Tuotetta **123** valmistettiin kaksi kertaa. Molemmilla kerroilla saanto oli kvantitatiivinen. Tuotteiden muodostumista ja puhtautta tarkasteltiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Molempien tuotteiden spektreissä nähtiin metoksiyhmälle tyypillinen signaali kemiallisen siirtymän arvolla 3,65 ppm. Lisäksi molemmilla synteesikerroilla signaalin integraali oli lähellä kolmea.

10.3 Metyyli-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (124)

Tuotetta **124** valmistettiin kerran. Saanto oli kvantitatiivinen. Tuotteen muodostuminen ja puhtaus tarkistettiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Spektrissä havaittiin metoksi-ryhmän signaali kemiallisen siirtymän arvolla 3,65 ppm. Signaalin integraali oli lähellä kolmea.

10.4 Metyyli-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (125)

Tuotetta **125** valmistettiin kerran. Myös tämän tuotteen muodostuminen ja puhtaus varmistettiin ^1H NMR -spektroskopian avulla (liite 1.1). Spektrissä havaittiin metoksi-ryhmälle tyypillinen signaali, jonka integraali oli kolme ja kemiallisen siirtymän arvo 3,64 ppm. Sappihapon 7 β - ja 12 β -protonien signaalit nähtiin kemiallisen siirtymän arvoilla 3,80 ja 3,95 ppm. Signaalien integraalit olivat lähellä yhtä. Liuottimena käytetyn metanolin metyyli-signaali havaittiin kemiallisen siirtymän arvolla 3,34 ppm. Koska tuotteen joukossa oli liuotinta, punnittiin tuotteen massaksi 6,77 g teoreettisen saannon ollessa 6,33 g.

10.5 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (126)

Reaktioseosta refluksoitettiin öljyhauteella viikonlopun yli. Koska synteesissä käytettiin 20-kertaista amiiniylimäärää, oli sen poistaminen haastavaa. Useista vesipesuista huolimatta raakatuotteeseen jäi reagoimatonta diamiinia, minkä vuoksi raakatuote uudelleenkiteytettiin asetonitrilistä. Uudelleenkiteytetystä tuotteesta mitattiin ^1H NMR -spekttri deuteroidussa metanolissa. Spektrissä havaittiin 25- ja 26-metyleeniprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 3,26 ja 2,75 ppm. Vastaavat integraalit olivat 1,91 ja 2,30. Saanto oli 3,19 g (52 % teoreettisesta saannosta).

10.6 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (127)

Tuotetta **127** tehtiin kahdesti. Ensimmäisellä kerralla diamiinin määrä (15 x n(MeCDCA)) ei ollut riittävä, sillä vaikka refluksointia jatkettiin 6 vuorokauden ajan, ei reaktio edennyt loppuun saakka. Raakatuotetta käsiteltiin kuten edellä. Tästä huolimatta spektrissä havaittiin jäämiä reagoimattomasta diamiinista. Lopulta diamiinijäämät saatiin pois tuotteen joukosta pesemällä raakatuotetta useita kertoja jäävedellä. ¹H NMR -spektrin perusteella voitiin todeta, että tuote oli saatu melko puhtaaksi; spektrissä ei havaittu vapaan diamiinin signaaleja. Lisäksi havaittiin aminoetyylisivuketjun 25- ja 26-metyyleeniprotonien tripletit kemiallisen siirtymän arvoilla 2,7 ppm ja 3,36 ppm (integraalit 2,05 ja 1,92). Saanto oli 2,65 g (83 % teoreettisesta saannosta).

Synteesi toistettiin käyttämällä 30-kertaista amiiniylimäärää ja seosta refluksoitiin 5 vrk öljyhauteella. Reaktion etenemistä seurattiin ¹H NMR -mittauksilla. Raakatuotetta käsiteltiin kuten edellä kohdassa 10.5. Tuotetta pestiin jäävedellä vesiliukoisen amiinin poistamiseksi ¹H NMR -spektroskopian perusteella tässä onnistuttiinkin. Vesipesujen seurauksena tuotteeseen jäi vettä, joka saatiin poistettua atseotrooppisella tislauksella toluenin kanssa. Saanto oli 3,87 g (81 % teoreettisesta saannosta).

10.7 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (128)

Synteesissä käytettiin 30-kertaista diamiiniylimäärää. Teknisen vian vuoksi refluksointi keskeytyi, mutta sitä jatkettiin seuraavana päivänä. Refluksointi kesti kaikkiaan viisi vuorokautta, ja reaktion etenemistä seurattiin NMR-spektroskopian avulla. Raakatuote saostettiin jäävedestä. Raakatuotetta pestiin vedellä kunnes suodos oli kirkasta. Vesipesun tarkoituksena oli poistaa ylimääräinen diamiini. Raakatuote suodatettiin imun avulla. Jäännösvesi poistettiin atseotrooppisella tislauksella toluenin kanssa. ¹H NMR -spektrissä (liite 2.1) havaittiin 25- ja 26-metyyleeniprotonien triplettisignaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 2,72 ja 3,23 ppm (integraalit 1,98 ja 2,02), Saanto oli 5,25 g (98 % teoreettisesta saannosta).

10.8 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (129)

Tuotetta **129** valmistettiin kerran. Amiiniylimäärästä huolimatta reaktio ei edennyt täydellisesti loppuun asti, ja se keskeytettiin neljä vuorokautta kestäneen refluksoinnin jälkeen. Raakatuotetta käsiteltiin kuten edellä. ^1H NMR -spektrin perusteella todettiin raakatuotteeseen jääneen epäpuhtauksia, joita pyrittiin poistamaan jäävesidikloorimetaanipesuilla. Kostean tuotteen saanto oli 5,41 g. ^1H NMR -spektrissä havaittiin 25- ja 26-metyleeniprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 2,72 ja 3,20 ppm. Signaalien integraalit olivat 2,55 ja 2,19. Tuotteen todettiin olevan riittävän puhdasta jatkokäyttöön.

10.9 *N*-{*N'*-[*N''*-(tert-Butoksykarbonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (130)

Tuotetta **130** valmistettiin kerran. Ongelmia aiheutti litokoolihapon aminoetyyliamidin heikko liukoisuus liuottimena käytettyyn dikloorimetaaniin. Litokoolihapon aminoetyyliamidi yritettiin saada liukenemaan kuivaan dikloorimetaaniin, mutta tässä ei onnistuttu. Seokseen lisättiin kuivaa 1,4-dioksaania, mutta liukoisuus ei parantunut. Sen sijaan muodostui suspensio, joka reaktiokolviin lisäyksen aikana tukki tiputussuppilon.

Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti käyttäen eluenttina CHCl_3 :MeOH 98:2- seosta. ^1H NMR -spektrin (liite 3.1) perusteella haluttua tuotetta voitiin todeta muodostuneen. Asian varmistivat Boc-suojausryhmän signaali kemiallisen siirtymän arvolla 1,5 ppm, 25- ja 26-metyleeniprotonien signaalit kemiallisen siirtymän arvolla 3,6 ppm sekä proliinin CH_2 - ja CH -signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 3,64 ppm ja 4,19 ppm. Lisäksi spektrissä nähdään NH- protonit kemiallisen siirtymän arvoilla 6,84 ja 6,34 ppm integraalien ollessa 1,00 ja 1,04. Tuotteesta mitattiin myös ^{13}C - (liite 3.2), ^{13}C DEPT-135-, PFG ^1H , ^{13}C HMQC- ja PFG ^1H , ^{13}C HMBC NMR -spektrit sekä massaspektri (liite 3.3)

ESI-TOF-massaspektrissä (liite 3.3) havaittiin tuotteen $[M + H]^+$ -adduktin signaali m/z -arvolla 616,57. Yhdisteen moolimassa on 615,89 g/mol. Myös tuotteen $[M + Na]^+$ -addukti m/z -arvolla 638,55 näkyy spektrissä. Signaalin m/z -arvolla 517,52-todettiin aiheutuvan tuotteesta, jonka Boc-suojaus oli purkautunut.

Tuotteelle tehtiin myös alkuaineanalyysi, jossa yhdestä näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta. Analyysitulosten keskiarvot olivat N: 6,12, C: 67,35 H: 9,82, laskennallisten arvojen ollessa N: 6,16, C:70,21, H: 9,93.

10.10 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksidikarboxyyli)-*L*-prolinamidijetyyli]-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (131)}

Tuotteen **131** valmistuksessa lähtöaineena käytettiin aiemmin valmistettua kenodeoksi-koolihapon aminoetyyliamidia. Liuottimena käytettiin kuivaa tetrahydrofuraania. Muut reagenssit oli tislattu. Synteesi tehtiin huoneenlämmössä typpiatmosfäärissä ja reaktion etenemistä seurattiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Reaktion päätyttyä reaktioseoksesta haihdutettiin liuotin pois ja raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin, jotta vesiliuoksilla käsittely onnistuisi. Pesujen jälkeen tuote oli vaaleaa ja lasivillamaista. Tuotetta puhdistettiin pylväskromatografisesti; eluenttina käytettiin CHCl_3 : MeOH 90:10 -seosta. Saanto oli 0,81 g (35 % teoreettisesta saannosta). ^1H NMR -spektrissä (liite 4.1) nähtiin NH-protonit kemiallisen siirtymän arvoilla 6,35 ja 6,83 ppm, integraalien ollessa 1,0 ja 1,3. Myös proliinin signaali kemiallisen siirtymän arvolla 1,48 ppm havaittiin. Tuotteesta mitattiin myös ^{13}C - (liite 4.2), ^{13}C DEPT-135-, PFG ^1H , ^{13}C HMQC- ja PFG ^1H , ^{13}C HMBC NMR -spektrit.

ESI-TOF -massaspektrissä (liite 4.3) havaittiin tuotteen $[M + Na]^+$ -addukti m/z -arvolla 654,59. Myös tässä spektrissä havaittiin signaali m/z -arvolla 554,50. Tämä aiheutui tuotteesta, jonka Boc-suojaus oli purkautunut. Tuotteelle tehtiin myös alkuaineanalyysi kahdesta rinnakkaisesta näytteestä. Mittaustulosten keskiarvot olivat N: 5,56 %, C: 60,84 %, H: 8,52 %. Laskennalliset arvot olivat C: 68,43, H: 9,73, N: 6,65.

10.11 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksykarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli}-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (132)

Tuotteen **132** valmistuksessa käytettiin lähtöaineena aiemmin valmistettua deoksikoolihapon aminoetyyliamidia. Liuottimena käytettiin kuivaa tetrahydrofuraania, johon lähtöaine liukeni hyvin. Synteesi tehtiin huoneenlämmössä typpiatmosfäärissä ja reaktion etenemistä seurattiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Reaktioseoksesta haihdutettiin liuotin pois ja raakatuote liuotettiin dikloorimetaniin, jotta vesiliuoksilla käsittely onnistuisi. Tuotetta puhdistettiin pylväskromatografisesti käyttäen eluentina CHCl_3 :MeOH 90:10 -seosta.

^1H NMR -spektrissä (liite 5.1) nähtiin proliinin Boc-suojauksen signaali $\sim 1,5$ ppm:n kohdalla. Samoin proliinin signaalit havaittiin kemiallisen siirtymän arvoilla 1,98; $\sim 3,5$ ja 4,13 ppm. Sappihapon 3β -protonin signaali $\sim 3,5$ ppm:n kohdalla jäi proliinin CH_2 -signaalin alle. Spektrissä nähdään lisäksi 12β -protonin signaali 4,2 ppm kohdalla sekä NH- protonit kemiallisen siirtymän arvoilla 7,16 ja 6,9 ppm integraalien ollessa 1,00 ja 1,02. Kuten muissakin synteeseissä, tuotteen joukkoon oli jäänyt pieni määrä reagoimattomia etyyliklooriformiaattia. Saanto oli 0,71 g (32 % teoreettisesta saannosta).

Yhdisteen 132 hiiliatomien numerointi esitetään kappaleessa 13 sivulla 79.

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 , ppm) (liite 5.2): δ 174,6 – 173,3 (C-24/27), 155,3 – 153,9 (C-32), 80,18 (C-33), 72,8 (C-12), 71,4 (C-3), 60,9 – 58,9 (C-28), 48,0 (C-14), 47,1 (C-29), 46,6 (C-17), 46,3(C-13), 41,9 (C-5), 39,5 (C-25/26), 39,0 (C-25/26), 36,2 (C-4), 35,8 (C-8), 35,2 (C-20), 35,1(C-1), 34,0 (C-10), 33,4 (C-9), 33,0 (C-23), 31,4 (C-22), 30,2 (C-2), 29,3(C-31), 28,4 (C-11), 28,2 (C-34,C-35,C-36), 27,4 (C-6/16), 27,0 (C-6/16), 26,1 (C-7), 24,2 – 24,3 (C-30), 23,6 (C-15), 22,9 (C-19), 17,2 (C-21), 12,5 (C-18).

^{13}C DEPT-135-, PFG ^1H , ^{13}C HMQC- ja PFG ^1H , ^{13}C HMBC NMR -spektrit esitetään liitteissä 5.3–5.5.

ESI-TOF -massaspektrissä (liite 5.6) havaittiin tuotteen $[\text{M} + \text{H}]^+$ - ja $[\text{M} + \text{Na}]^+$ -adduktien signaalit m/z -arvoilla 632,59 ja 654,45. Tuotteen moolimassa on 631,89 g/mol. Myös tässä spektrissä havaittiin signaali m/z -arvolla 554,50. Tämä aiheutui tuot-

teesta, jonka Boc-suojaus oli purkautunut. Tuotteelle tehtiin myös alkuaineanalyysi kahdesta rinnakkaisesta näytteestä. Analyysitulosten keskiarvot olivat N: 5,34 %, C: 61,11 %, H: 9,23 %. Laskennalliset arvot olivat N: 6,65 %, C: 68,43 %, H: 9,73 %.

10.12 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (133)

Synteesi **133** tehtiin kolme kertaa. Ensimmäisellä kerralla liuottimena käytettiin dikloorimetaania ja seuraavilla kerroilla tetrahydrofuraania. Koska lähtöaineena käytetty koolihapon aminoetyyliamidi ei liennut hyvin dikloorimetaaniin, ei reaktio edennyt toivotulla tavalla. Tämä varmistettiin käyttäen ¹H NMR -spektroskopiaa. Kun liuottimeksi vaihdettiin kuiva tetrahydrofuraani, saatiin sappihapon aminoetyyliamidi liukenemaan paremmin. THF haihdutettiin pois ja raakatuote liuotettiin dikloorimetaaniin. Raakatuotteesta mitattiin ¹H NMR -spektri (liite 6.1), jossa havaittiin proliinin Boc-suojauksen signaali kemiallisen siirtymän arvolla ~ 1,45 ppm, sekä proliinin signaalit kemiallisten siirtymien arvoilla 1,62, 3,33 ja 4,15 ppm. Spektrissä havaittiin myös etyyliklooriformiaatin signaalit kemiallisten siirtymien arvoilla ~ 4,49 ja 1,2 ppm. Saanto jäi valitettavan alhaiseksi ollen vain ~ 19 % teoreettisesta saannosta.

Kolmannella kerralla etyyliklooriformiaatti vaihdettiin isobutyliklooriformiaatiksi, ja liuottimena käytettiin kuivaa tetrahydrofuraania. Raakatuote puhdistettiin suoraan pylväspuhdistuksen avulla; eluenttina käytettiin CHCl₃:MeOH 88:12 -seosta.

Tuotteesta mitattiin ¹H NMR -spektri, jonka perusteella voitiin todeta, että haluttua tuotetta oli muodostunut. Epäpuhtautena näkyi liuotinjäämiä sekä mahdollisesti isobutyliklooriformiaattia. Saanto oli melko vaatimaton, 32 % teoreettisesta saannosta.

10.13 Boc-suojauksen poistaminen

Lopuksi tuote **130** pyrittiin vapauttamaan Boc-suojausryhmästään. Suojausryhmän poistoon käytettiin kahta erilaista menetelmää, joista toisessa käytettiin HCl:dioksaani seosta⁷⁴ ja toisessa trifluorietikkahappoa.⁷⁵

Ensimmäisen menetelmän tapauksessa Boc-suojatun tuotteen annettiin reagoida trifluorietikkahapon (TFA) kanssa huoneenlämmössä.⁷⁵ Tämän jälkeen raakatuotetta puhdistettiin pylväskromatografisesti, mutta se saostui pylvääseen, eivätkä kerätyt fraktiot sisältäneet ¹H NMR -spektrin perusteella täysin puhdasta tuotetta.

Toisessa menetelmässä reaktioseoksen annettiin reagoida TFA:n kanssa kylmässä. Mitatun ¹H NMR -spektrin perusteella suojausryhmä ei ollut hydrolysoitunut. Kun tuotteeseen lisättiin 20 x ylimäärä trifluorietikkahappoa ja seoksen annettiin reagoida huoneenlämmössä viikonlopun yli, havaittiin mitatun ¹H NMR -spektrin (liite 7.1) perusteella, että Boc-suojausryhmä oli hydrolysoitunut. Toisaalta TFA oli esteröitynyt sappihapon 3-asemaan Tämän seurauksena 3β-H:n signaalin havaittiin siirtyneen alakentälle ($\delta = 4.89$ ppm, 0,95).

Lopuksi suojausryhmän poistoa yritettiin käyttäen 4 M HCl:dioksaani-seosta.⁷⁴ Tuotetta sekoitettiin HCl:dioksaanissa huoneenlämmössä, minkä jälkeen sitä puhdistettiin pylväskromatografisesti. Pylvääseen saostui valkoista ainetta, joka oli mahdollisesti HCl-suolaa. Fraktioista mitattujen ¹H NMR -spektrien perusteella todettiin niiden olevan epäpuhtaita.

11 GEELINMUODOSTUSKOKEET

Kolmelle synteesituotteelle (**130**, **131**, **132**) tehtiin geelinmuodostuskokeita käyttäen yhteensä 36 eri liuotinta. Liuotinten valmistajat ja niiden puhtaudet on esitelty kappaleessa 2.2. Valmistettua tuotetta punnittiin 5 mg pieneen koeputkeen, jossa se liuotettiin 500 µl:aan valittua liuotinta. Yhdisteen liukenemista tarkkailtiin, ja jos yhdiste ei liuenut välittömästi, putkea sekoitettiin ultraäänihauteessa minuutin ajan. Jokaista koeputkea kuumennettiin varovasti kuumailmapuhaltimella, kunnes joko liuotin kiehui tai seos

muuttui kirkkaaksi. Putket suljettiin korkilla ja parafilmillä ja jätettiin huoneenlämpöön, jotta mahdollinen kiteytyminen tai geelinmuodostus tapahtuisi. Havainnot esitetään taulukossa 4. Valitettavasti yksikään tutkituista tuotteista ei muodostanut geeliä käytetyissä luottimissa.

Taulukko 4. Geelinmuodostuskokeissa käytetyt liuottimet ja kokeiden tulokset

Numero	Liuoitin	130	131	132
1	Bentseeni	P	S	Ps ⁺ , s
2	Toluenei	Ps	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
3	Etyylibentseeni	Ps	S	S
4	<i>o</i> -Ksyleeni	S	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
5	<i>m</i> -Ksyleeni	Ps	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
6	<i>p</i> -Ksyleeni	Ps	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
7	Mesityleeni	Ps	Ps	Ps ⁺ , ps
8	<i>tert</i> -Butyylibentseeni	Ps	Ps	Ps ⁺ , s
9	Kumeeni	Ps	Ps	Ps ⁺ , s
10	Klooribentseeni	Ps	S ⁺ , s	Ps ⁺ , s
11	Anisoli	Ps	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
12	Asetonitrili	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
13	Dikloorimetaani	Ps/l	S ⁺ , s	S ⁺ , s
14	Tetrakloorimetaani	I	Ps	Ps ⁺ , ps
15	Asetoni	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
16	Etyyliasetatti	Ps	S ⁺ , s	S ⁺ , s
17	1-Pentanoli	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
18	1,4-Dioksaani	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
19	2-Propanoli	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
20	1-Butanol	S	S ⁺ , s	S ⁺ , s
21	1-Oktanoli	S	Ps ⁺ , s	S ⁺ , s
22	Cyclohexanol	S	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
23	<i>n</i> -Heksaani	I	Ps+/I	Ps/l
24	Dietyylieetteri	-	I	I
25	Tetrahydrofuraani	S ⁺	S ⁺ , s	S ⁺ , s
26	<i>N,N</i> -Dimetyyliformamidi	Ps ⁺ , s	S ⁺ , s	S ⁺ , s
27	Kloroformi	S ⁺ , s	S ⁺ , s	S ⁺ , s
28	Pyridiini	-	S ⁺ , s	S ⁺ , s
29	Dimetyylisulfoksidi	S ⁺ , s	S ⁺ , s	S ⁺ , s
30	Etikkahappo	-	S ⁺ , s	S ⁺ , s
31	Metanoli	S ⁺ , s	S ⁺ , s	S ⁺ , s
32	Muurahaishappo	-	S ⁺ , s	S ⁺ , s
33	Formamidi	Ps ⁺ , s	S ⁺ , s	Ps ⁺ , s
34	Vesi	I	I, Ps	I, Ps
35	Etyleeniglykoli	Ps	Ps ⁺ , s	Ps ⁺ , s
36	Syklohekseeni	Ps	Ps ⁺ , s	S ⁺ , s

S⁺/s⁺ = liukenee ilman lämmitystä, S/s = liukenee lämmitettäessä, Ps⁺ = osittain liukeneva ilman lämmitystä, Ps = osittain liukeneva lämmitettäessä, I = liukenematon, - = ei tutkittu.

12 SYNTEESIOHJEET

12.1 Metyyli-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (122)

Litokoolihappo **1** (6,54 g, 15,0 mmol) punnittiin 100 ml:n kolviin, ja liuotettiin 60 ml:aan metanolia. Katalyytiksi lisättiin pari pisaraa asetyylikloridia. Reaktioseosta refluksoitettiin öljyhauteella yön yli noin +90 °C:ssa. Refluksoinnin päätyttyä liuotin haihdutettiin pois mahdollisimman hyvin ja vaaleasta kiteisestä tuotteesta mitattiin ¹H NMR -spektri. Spektrin perusteella tuotteen havaittiin olevan riittävän puhdasta seuraavaa vaihetta varten. Saanto 5,60 g (98 %, 14,3 mmol).

12.2 Metyyli-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (123)

Kenodeoksikoolihappo **2** (5,88 g, 15,0 mmol) punnittiin 250 ml:n kolviin. Tuotteen synteesi ja jatkokäsittely tehtiin samoin kuin edellä kohdassa 12.1. Tuotteen muodostuminen ja puhtaus varmistettiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. Saanto 6,09 g (97 %, 14,9 mmol).

12.3 Metyyli-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (124)

Deoksikoolihappo **3** (5,88 g, 15,0 mmol) punnittiin 250 ml:n kolviin, ja liuotettiin metanoliin. Synteesi suoritettiin kuten edellä. ¹H NMR -spektrissä havaittiin jäännösmetanolista aiheutuva signaali. Jäännösmetanolin seurauksena saanto oli 6,60 g, teoreettisen saannon ollessa 6,10 g. Tuote oli kuitenkin riittävän puhdasta käytettäväksi seuraavassa synteesivaiheessa.

12.4 Metyyli-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (125)

Tuotetta **125** valmistettiin samalla menetelmällä kuin edellä. Koolihappo **4** (6,13 g, 15,0 mmol) punnittiin 250 ml:n kolviin. Tuotteen muodostuminen ja puhtaus varmistettiin ¹H

NMR -spektroskopian avulla. Spektrin perusteella tuotteen joukossa oli liuotinjäämiä, minkä vuoksi sitä kuivattiin vakuumilinjassa ennen seuraavaa vaihetta. Saanto oli kvantitatiivinen.

12.5 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (126)

Litokoolihapon metyyliesteri (**122**) (5,57 g, 0,015 mol) punnittiin 250 ml:n kolviin ja se suspentoitiin metanoliin. Tämän jälkeen lisättiin 10 ml (0,14 mol) etyleenidiamiinia ja seosta refluksoitiiin öljyhauteella +90 °C:ssa viikonlopun yli. Reaktioseoksesta mitattiin ¹H NMR -spektri, jonka perusteella todettiin, että reaktio ei ole edennyt loppuun saakka. Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin vielä 10 ml etyleenidiamiinia eli amiiniylimäärä kasvatettiin 20-kertaiseksi metyyliesteriin nähden, ja refluksointia jatkettiin vielä kaksi vuorokautta. Tämän jälkeen mitatusta ¹H NMR -spektristä nähtiin, että reaktio oli edennyt lähes loppuun. Reaktioseoksesta haihdutettiin metanolia pois ja haihdutusjäännös kaadettiin jääveteen. Muodostunut saostuma suodatettiin ja saostumaa pestiin vielä jäävedellä, jotta diamiinijäämät saataisiin pois. Raakatuotteeseen jäi kuitenkin diamiinia, minkä vuoksi tuote uudelleenkitetyttiin asetonitriilistä. Tuotetta kuivattiin vakuumilinjassa ja siitä mitattiin ¹H NMR -spektri. Spektrin perusteella todettiin tuotteen joukossa olevan edelleen pieni määrä ylimääräistä etyleenidiamiinia. Tuotteen katsottiin kuitenkin olevan riittävän puhdasta jatkoreaktioon. Saanto 3,19 g (52 %, 7,61 mmol).

12.6 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (127)

Kenodeoksikoolihapon metyyliesteri **123** (3,56 g, 0,0089 mol) punnittiin 250 ml:n kolviin. Kolviin lisättiin 30 ml metanolia ja 18 ml (0,27 mol) etyleenidiamiinia. Seosta refluksoitiiin öljyhauteella noin 90 tunnin ajan. Reaktioseoksesta haihdutettiin metanolia pois, lisättiin 60 ml tolueenia ja haihdutettiin liuotin pois. Tolueenin lisäys ja haihdutus toistettiin. Seuraavaksi reaktioseokseen lisättiin 20 ml jäävettä ja 20 ml metanolia, ja liuottimet haihdutettiin jälleen pois. Tämän jälkeen lisättiin 20 ml metanoli:asetonitriili (1:1) -seosta ja haihdutettiin liuotin pois. Lopuksi käsittely toistettiin jääveden ja metanolin lisäyksestä alkaen. Raakatuotetta pestiin jäävedellä (4 x 50 ml), jolloin raaka-

tuote muuttui ruskeaksi liisteriksi. Vedestä pyrittiin eroon liuottamalla tuote 40 ml:aan tolueenia ja haihduttamalla liuottimet pois. Ruskea liisteri muuttui vaaleanoranssiksi kiteiseksi tuotteeksi, joka lopulta kuivattiin vakuumilinjassa. Saanto 3,14 g, (81 %, 0,0072 mol).

12.7 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (128)

Deoksikoolihapon metyyliesteri **124** (6,59 g, 0,016 mol) punnittiin 250 ml:n kolviin, jonne lisättiin 40 ml metanolia ja 33 ml (0,48 mol) etyleenidiamiinia. Reaktioseosta refluksottiin öljyhauteella 96 tunnin ajan ja reaktion etenemistä seurattiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Raakatuote saostettiin kaatamalla reaktioseos jääveteen. Kiteet suodatettiin imun avulla ja niitä pestiin jäävedellä, kunnes suodos oli kirkasta. Saanto 5,25 g (98 %, 0,012 mol).

12.8 *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (129)

Koolihapon metyyliesteri **125** (4,95 g, 0,012 mol) punnittiin 250 ml:n kolviin, jonne lisättiin 80 ml metanolia ja 16 ml (0,23 mol) etyleenidiamiinia. Seosta refluksottiin öljyhauteella 96 tunnin ajan. Reaktio etenemistä seurattiin ^1H NMR -spektroskopian avulla. Reaktioseoksesta haihdutettiin metanolia pois, lisättiin 60 ml tolueenia, ja haihdutettiin liuotin pois. Tolueenin lisäys ja haihdutus toistettiin. Seuraavaksi reaktioseokseen lisättiin 20 ml jäävettä ja 20 ml metanolia, ja haihdutettiin liuotin uudelleen pois. Tämän jälkeen lisättiin 20 ml metanoli:asetonitriili (1:1) -seosta ja haihdutettiin liuotin pois. Käsittely toistettiin jääveden ja metanolin lisäyksestä alkaen. Raakatuote oli likaisen vaalea ja liimamainen. Koska ^1H NMR -spektri perusteella tuotteen joukossa oli runsaasti asetonitriiliä, tuotetta puhdistettiin liuottamalla se jääveteen ja uuttamalla sitä erotussuppilossa dikloorimetaanilla (4 x 20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 lla, suodatettiin ja haihdutettiin liuotin pois. Saanto oli 5,405 g teoreettisen saannon ollessa 5,275 g.

12.9 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksykarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli}-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (130)

N-Boc-proliini (0,82 g, 0,0037 mol) punnittiin 250 ml:n 3-kaulakolviin, ja liuotettiin 30 ml:aan kuivaa dikloorimetaania. Seokseen lisättiin 460 μ l (0,0042 mol) tislattua *N*-metyylimorfoliinia ja seos jäähdytettiin CaCl₂-jäähauteella -20 °C:een. Kylmään reaktioseokseen lisättiin 360 μ l (0,0037 mol) tislattua etyyliklooriformiaattia ja sekoitusta jatkettiin kylmässä viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön. Lämpenemisen aikana seokseen yritettiin lisätä litokoolihapon etyyleenidiamiinin (1,44 g, 3,4 mmol) ja dikloorimetaani/1,4-dioksaanin (10 ml) suspensio tiputussuppilon avulla huonolla menestyksellä. Lopulta suspensio kaadettiin lasisuppilon avulla kolviin ja sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä N₂-atmosfäärissä 24 tunnin ajan.

Vuorokauden jälkeen reaktioseos siirrettiin erotussuppiloon ja orgaanista kerrosta pestiin 0,1 M HCl-liuoksella (3 x 10 ml), kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 x 10 ml) sekä kylläisellä NaCl-liuoksella (3 x 10 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja liuotin evaporoitiin pois. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti käyttäen eluenttina dikloorimetaani:metanoli 98:2 -seosta. Puhdistettua tuotetta kuivatettiin vakuuminlinjassa ja siitä mitattiin ¹H NMR -spektri. Lupaavan tuloksen perusteella tuotteesta mitattiin myös ¹³C ¹³C DEPT-135 PFG ¹H, ¹³C HMQC- ja PFG ¹H, ¹³C HMBC NMR -spektrit. Saanto 0,51 g (25 %, 8,28 x 10⁻⁴ mol).

12.10 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksykarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (131)

N-Boc-proliini punnittiin (0,87 g, 0,0041 mol) 250 ml:n 3-kaulakolviin, ja liuotettiin 30 ml:aan kuivaa tetrahydrofuraania. Sen jälkeen lisättiin 494 μ l (0,0045 mol) *N*-metyylimorfoliinia ja reaktioseos jäähdytettiin CaCl₂-jäähauteella -20 °C:een. Kylmään reaktioseokseen lisättiin 331 μ l (0,0041 mol) etyyliklooriformiaattia ja sekoitusta jatkettiin kylmässä viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja seoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön. Tiputussuppilon kautta seokseen lisättiin 1,60 g (0,0037 mol) kenodeoksikoolihapon aminoetyyliamidia, joka oli liuotettu 10 ml:aan

THF:a. Sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä N₂-atmosfäärissä 24 tunnin ajan. Reakti-
on etenemistä seurattiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. THF haihdutettiin pois pyörö-
haihduttimella ja jäännös liuotettiin 35 ml:aan dikloorimetaania. Orgaanista kerrosta
pestiin 0,1 M HCl -liuoksella (3 x 10 ml), kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 x 10 ml)
sekä kylläisellä NaCl-liuoksella (3 x 10 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaa-
tilla, suodatettiin ja haihdutettiin liuotin pois. Tuote puhdistettiin pylväskromatografi-
sesti käyttäen eluenttina CHCl₃:MeOH 90:10 -seosta. Tuote kuivattiin vakuuminlinjassa
minkä jälkeen siitä mitattiin ¹H NMR -spektri. Lupaavan tuloksen perusteella tuotteesta
mitattiin myös ¹³C, ¹³C DEPT-135-, PFG ¹H, ¹³C HMQC- ja PFG ¹H, ¹³C HMBC NMR -
spektrit. Saanto 0,80 g (34 %, 0,0012 mol).

**12.11 *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli}-*3α,12α*-
dihydroksi-*5β*-kolan-*24*-amidi (132)**

N-Boc-proliini punnittiin (0,83 g, 0,0038 mol) 250 ml:n 3-kaulakolviin, ja liuotettiin 30
ml:aan kuivaa tetrahydrofuraania. Sen jälkeen lisättiin 467 µl (0,0043 mol) *N*-
metyylimorfoliinia ja reaktioseos jäähdytettiin CaCl₂-jäähauteella -20 °C:een. Kylmään
reaktioseokseen lisättiin 368 µl (0,0038 mol) etyyliklooriformiaattia ja sekoitusta jatket-
tiin kylmässä viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja seoksen an-
nettiin lämmetä huoneenlämpöön. Tiputussuppilon kautta seokseen lisättiin 1,52 g
(0,0035 mol) deoksikoolihapon aminoetyyliamidia, joka oli liuotettu 10 ml:aan THF:a.
Sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä N₂-atmosfäärissä 24 tunnin ajan. Reakti-
on etenemistä seurattiin ¹H NMR -spektroskopian avulla. THF haihdutettiin pois pyöröhaih-
duttimella ja jäännös liuotettiin 30 ml:aan dikloorimetaania. Orgaanista kerrosta pestiin
0,1 M HCl -liuoksella (3 x 10 ml), kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 x 10 ml) sekä kyl-
läisellä NaCl-liuoksella (3 x 10 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suo-
datettiin ja haihdutettiin liuotin pois. Vaaleasta lasivillamaisesta tuotteesta mitattiin ¹H
NMR -spektri. Tuote kuivattiin vakuuminlinjassa. Saanto 0,70 g (32 %, 0,0011 mol).

12.12 *N*-[*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksykarbonyyli)-*L*-prolinamidi]etyyli]-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (133)

Yhdistettä **133** tehtiin kolme kertaa. Ensimmäisellä kerralla liuottimena käytettiin dikloorimetaania ja kahdella seuraavalla kerralla kuivaa tetrahydrofuraania. Tässä annetaan ohje kahden jälkimmäisen reaktion suorittamiseen.

N-Boc-proliini (0,93 g, 0,0039 mol) lisättiin 250 ml:n 3-kaulakolviin, ja liuotettiin 25 ml:aan kuivaa tetrahydrofuraania. Seokseen lisättiin 527 μ l (0,0047 mol) *N*-metyylimorfoliinia ja seos jäähdytettiin CaCl₂-jäähauteella -20 °C:een. Kylmään reaktioseokseen lisättiin 415 μ l (0,0043 mol) etyylidiklooriformiaattia ja sekoitusta jatkettiin kylmässä viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön. Tiputussuppilon kautta seokseen lisättiin koolihapon amiinoetyyliamidi (1,02 g, 0,0023 mol), joka oli liuotettu 10 ml:aan THF:a. Sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä N₂-atmosfäärissä 24 tunnin ajan. Tuotteen muodostumista tarkasteltiin ¹H NMR –spektroskopian avulla. THF haihdutettiin pois pyöröhaihduttimella ja jäljelle jäänyt sakka liuotettiin 20 ml:aan dikloorimetaania. Orgaanista faasia pestiin 0,1 M HCl-liuoksella (3 x 20 ml), kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (3 x 20 ml) sekä kylläisellä NaCl-liuoksella (3 x 20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuotteen saanto oli 0,48 g (19 %, 7,43 x 10⁻⁴ mol)

Kolmannella synteesikerralla etyylidiklooriformiaatti korvattiin isobutyylidiklooriformiaattilla (0,34 g, 0,0028 mol). Muuten olosuhteet olivat samat kuin aiemmin. Raakatuotteelle tehtiin pylväspuhdistus, jossa eluentina käytettiin CHCl₃:MeOH 88:12 -seosta. Tuotteesta mitattiin ¹H NMR -spektri, jonka perusteella haluttua tuotetta havaittiin muodostuneen. Lisäksi havaittiin liuotin- ja mahdollisesti isobutyylidiklooriformiaatin jäämiä.

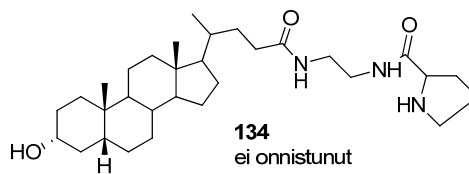
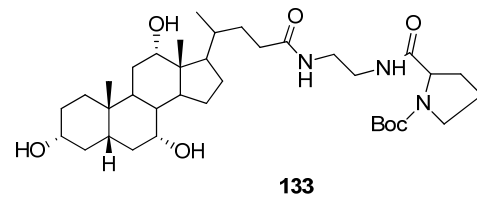
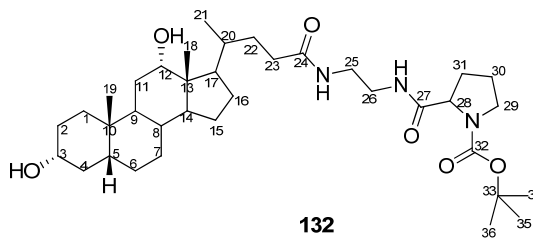
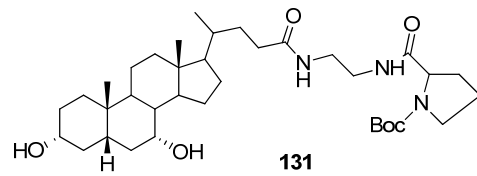
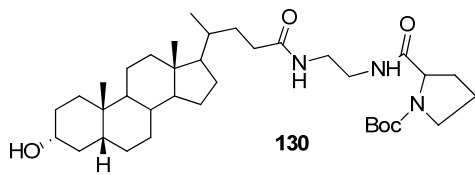
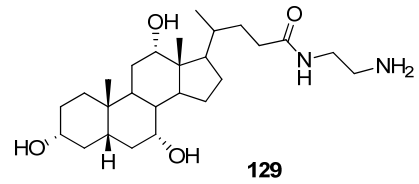
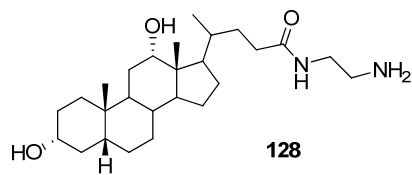
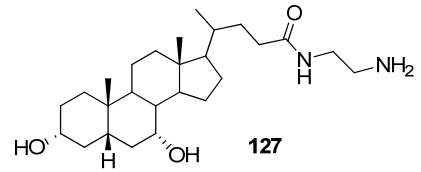
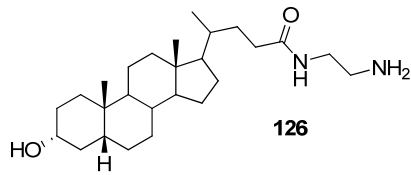
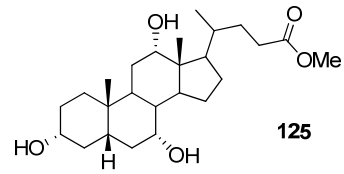
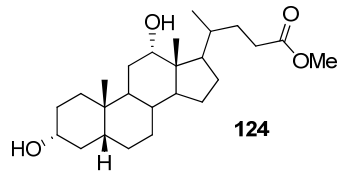
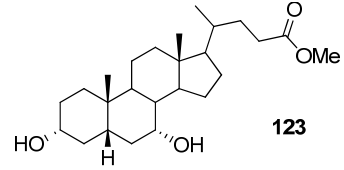
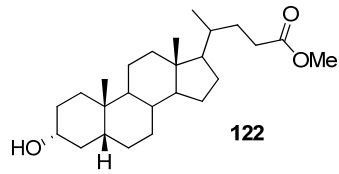
12.13 *N*-[(*N'*-*L*-Prolinamidi)etyyli]-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (134)

Suojauksen purkamista yritettiin kolme kertaa käyttäen kahta eri menetelmää. Taaratuun kolviin punnittiin 0,25 g (3,90 x 10⁻⁴ mol) aiemmin valmistettua litokoolihapon

aminoetyyliamidin Boc-proliinikonjugaattia (**130**), joka liuotettiin dikloorimetaaniin (5 ml). Seokseen lisättiin 598 μl (0,0078 mol) trifluorietikkahappoa ja sekoitettiin typpi-atmosfäärissä yön yli. Sekoituksen jälkeen reaktioseokseen lisättiin 5 % NaHCO_3 -liuosta, jolloin muodostui valkea saostuma. Saostumaa uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 30 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaCl -liuoksella (3 x 50 ml), kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. ^1H NMR -spektrin perusteella todettiin, että suojaus oli purkautunut osittain. Tämän jälkeen raakatuotteeseen lisättiin 4 M HCl :dioksaani -seosta ja sekoitettiin huoneenlämmössä 30 minuutin ajan. Liuotin haihdutettiin pois ja jäännöksestä mitattiin ^1H NMR -spektri. Spektrin perusteella todettiin tuotteen kuitenkin olevan epäpuhdasta. Tuotetta puhdistettiin pylväskromatografisesti CH_2Cl_2 : MeOH 10:1 -seoksella. Tuote saostui pylväeseen, josta se lopulta eluoiitiin $\text{MeOH}:\text{Et}_3\text{N}$ 50:2 -seoksella. ^1H NMR -spektrin perusteella tuotetta ei saatu puhdistettua.

Kolmannella kerralla taarattuun 25 ml:n 2-kaulakolviin punnittiin 0,20 g ($3,25 \times 10^{-4}$ mol) litokoolihapon aminoetyyliamidin Boc-proliinikonjugaattia (**130**), joka liuotettiin CH_2Cl_2 :iin (5 ml) Seokseen lisättiin 231 μl (0,0030 mol) TFA:a ja sekoitettiin 0 °C:ssa 2,5 tuntia. Sekoituksen jälkeen reaktioseokseen lisättiin 2 M NaOH :a, kunnes pH oli 12 (1,5 ml). Tässä vaiheessa vesifaasin väri muuttui sinertäväksi. Erotussuppilossa seosta uutettiin dikloorimetaanilla. Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaCl -liuoksella (3 x 5 ml), kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin liuotin pois. Tuote oli kellertävää ja liimamaista. Mitattiin ^1H NMR -spektri, jossa havaittiin Boc-ryhmän metyyliiryhmien signaali kemiallisen siirtymän arvolla $\sim 1,5$ ppm. Tästä voitiin todeta, että Boc-suojaus ei ollut hydrolysoitunut. Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin 0,479 μl (0,0064 mol) TFA:a ja sekoitettiin huoneen lämpötilassa 48 h ajan. Reaktioseos neutraloitiin 10 % NaHCO_3 -liuoksella, ja muodostunutta valkoista sakkaa uutettiin erotussuppilossa CH_2Cl_2 :lla (3 x 30 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaCl -liuoksella (3 x 50 ml), kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin liuotin pois. Tuotteesta mitattiin ^1H NMR -spektri. Spektrin perusteella todettiin, että sappihapon 3α -asemassa oleva hydroksyyliiryhmä oli esteröitynyt trifluorietikkahapon kanssa. Toisaalta Boc-suojaus oli hydrolysoitunut.

13 VALMISTETUT TUOTTEET



14 YHTEENVETO

Erikoistyön tarkoituksena oli valmistaa nelivaiheista synteesireittiä käyttäen sappihappojen aminoetyyliamidien ja L-proliinin konjugaatteja. Työn tarkoituksena oli tutkia valmistettujen yhdisteiden geeliytymisominaisuuksia. Sappihapoista valmistettiin ensin metyyliesterit, joihin konjugoitiin amidisidoksella etyleenidiamiini. Näin muodostuneeseen sappihapon aminoetyyliamidiin konjugoitiin Boc-suojattu L-proliini toisella amidisidoksella. Boc-suojauksen purkamista kokeiltiin menestyksettä eri menetelmin. Etyleenidiamiiniylimäärä aiheutti ongelmia, joista osa onnistuttiin ratkaisemaan. Ainoastaan koolihappo aiheutti lähes ylitsepääsemättömiä ongelmia: sen aminoetyyliamidin valmistaminen ja puhdistaminen osoittautuivat vaikeiksi eikä tuotetta saatu puhtaana.

Erikoistyössä käytettiin yleisimpiä orgaanisen kemian synteeseissä käytettyjä työmenetelmiä ja samoja työvaiheita toistettiin, mikä antoi varmuutta synteesityöskentelyyn. Myös erilaisten mittaus- ja karakterisointimenetelmien käytöstä saatiin kokemusta

Erikoistyössä kohdattiin vaikeita ongelmatilanteita, mutta asiantuntevan avun ja hyvien neuvojen avulla niistäkin selvittiin.

15 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. A. Hofmann, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461–2483.
2. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1927/wieland.htm, (13.3.2012).
3. P. B. Hylemon, H. Zhou, W. M. Pandak, S. Ren, G. Gil, P. Dent, Bile acids as regulatory molecules, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1509–1520.
4. E. Sievänen, Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design, *Molecules* **2007**, *12*, 1859–1889.
5. V. V. Prabha, M. Ohri, Review: Bacterial transformations of bile acids, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 191–196.
6. E. Haug, O. Sand, Ø. V. Sjaastad, K. C. Toverud and K. Sillman, *Ihmisen fysiologia*, WSOY, Porvoo, **1999**.
7. M. K. Campbell, S. O. Farrell, *Biochemistry*, 5th ed., international student ed., Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, **2006**.
8. N. A. Campbell, J. B. Reece, L. A. Urry, *Biology*, 8th ed., Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, Ca, **2008**.
9. D. Whitford, *Proteins: structure and function*, John Wiley & Sons, Chichester, cop. **2005**.
10. http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2004/MB_cgi?field=entry&term=Oligopeptides, (6.3.2012).
11. J. Heino, M. Vuento, *Biokemian ja solubiologian perusteet*, 2. uud. p., Helsinki, **2010**.
12. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.
13. S. Bondi, E. Muller, Synthesis of the glycocholic acid and taurocholic acid, *Z. Physiol. Chem.* **1906**, *49*, 499–506.
14. J. Sjövall, Fifty years with bile acids and steroids in health and disease, *Lipids* **2004**, *39*, 703–722.

15. H. R. Ferhat Karabulut, S. A. Rashdan, J. R. Dias, Notable chenodeoxycholic acid oligomers-synthesis, characterization, and 7α -OR steric hindrance evaluation, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5030–5035.
16. V. Janout, S. L. Regen, Bioconjugate-Based Molecular Umbrellas, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 183–192.
17. W-H. Chen, V. Janout, M. Kondo, A. Mosoian, G. Mosoyan, R. R. Petrov, M. E. Klotman, S. L. Regen, A Fine Line Between Molecular Umbrella Transport and Ionophoric Activity, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 1711–1715.
18. L. L. Cline, V. Janout, M. Fisher, R. L. Juliano, S. L. Regen, A Molecular Umbrella Approach to the Intracellular Delivery of Small Interfering RNA, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2210–2216.
19. M. Mehiri, B. Jing, D. Ringhoff, V. Janout, L. Cassimeris, S. L. Regen, Cellular Entry and Nuclear Targeting By a Highly Anionic Molecular Umbrella, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1510–1513.
20. P. Bandyopadhyay, S. L. Regen, P. Bandyopadhyay, Ion Conductors Derived from Biogenic Amines, Bile Acids, and Amino Acids, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 1314–1318.
21. J. Tuomisto, M. K. Paasonen, L. Ahtee, *Farmakologia ja toksikologia*, 7. uud. p., Medicina, Kuopio, **2007**.
22. A. Sirikulkajorn, T. Tuntulani, V. Ruangpornvisuti, B. Tomapatanaget, A. P. Davis, A steroid-based receptor for unprotected amino acids: the enantioselective recognition of l-tryptophan, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7423–7428.
23. J. Wang, X. Y. Yuan, J. Y. Wang, S. H. Chen, Design and synthesis of chiral single-armed molecular tweezers derived from α -hyodeoxycholic acid, *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20*, 265–268.
24. E. Virtanen, J. Tamminen, J. Linnanto, P. Mänttari, P. Vainiotalo, E. Kolehmainen, Synthesis, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , and ^{113}Cd NMR, ESI-TOF MS, Semiempirical MO (PM3), ab initio/HF and Cation/Anion Binding Studies of *N*-deoxycholyl-l-tryptophan, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, *43*, 319–327.
25. A. F. Hofmann, The preparation of chenodeoxycholic acid and its glycine and taurine conjugates, *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 173–186.
26. A. Norman, Preparation of conjugated bile acids using mixed carboxylic acid anhydrides, *Ark. Kemi.* **1955**, *8*, 331.
27. L. A. Wessjohann, Synthesis of Steroid–Biaryl Ether Hybrid Macrocycles with High Skeletal and Side Chain Variability by Multiple Multicomponent Macrocyclization Including Bifunctional Building Blocks, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7521–7526.

28. D. G. Rivera, O. Pando, R. Bosch, L. A. Wessjohann, A Biomimetic Approach for Polyfunctional Secocholanes: Tuning Flexibility and Functionality on Peptidic and Macrocyclic Scaffolds Derived from Bile Acids, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6229–6238.
29. D. G. Rivera, L. A. Wessjohann, Synthesis of Novel Steroid-Peptoid Hybrid Macrocycles by Multiple Multicomponent Macrocyclizations Including Bifunctional Building Blocks (MiBs), *Molecules* **2007**, *12*, 1890–1899.
30. D. Albert, M. Feigel, β -Loop, γ -loop, and helical peptide conformations in cyclopeptides containing a steroidal pseudo-amino acid, *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 2168–2181.
31. J. W. Steed, Supramolecular gel chemistry: developments over the last decade, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1379–1383.
32. P. Terech, R. G. Weiss, Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3133–3160.
33. U. Maitra, A. Chakrabarty, Protonation and deprotonation induced organo/hydrogelation: Bile acid derived gelators containing a basic side chain, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 304–309.
34. K. Hanabusa, Y. Maesaka, M. Kimura, H. Shirai, New gelators based on 2-amino-2-phenylethanol: Close gelator-chiral structure relationship, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2385–2388.
35. H. M. Willemen, T. Vermonden, A. T. M. Marcelis, E. J. R. Sudhölter, N-Cholyl Amino Acid Alkyl Esters A Novel Class of Organogelators, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2329–2335.
36. V. Noponen, Nonappa, M. Lahtinen, A. Valkonen, H. Salo, E. Kolehmainen, E. Sievänen, Bile acid-amino acid ester conjugates: gelation, structural properties, and thermoreversible solid to solid phase transition, *Soft Matter* **2010**, *6*, 3789–3796.
37. T. Järvinen, J. Rautio, R. Niemi, Aihio lääkkeet, *Duodecim* **1997**, *113*, 2564–2568.
38. W. Kramer, G. Wess, Bile acid transport systems as pharmaceutical targets, *Eur. J. Clin. Invest.* **1996**, *26*, 715–732.
39. M. V. St-Pierre, G. A. Kullak-Ublick, B. Hagenbuch, P. J. Meier, Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues, *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 1673–1686.
40. J. Tamminen, *Sappihappojen ja niiden johdannaisten lääketieteellinen käyttö*, Pro Gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, orgaanisen kemian osasto, Jyväskylä, **1996**.
41. A. Ray, A. Banerjee, C. Chang, C. M. Khantwal, P. W. Swaan, Design of novel synthetic MTS conjugates of bile acids for site-directed sulfhydryl labeling of cys-

- teine residues in bile acid binding and transporting proteins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1473–1476.
42. A. Al-Jabri, M. D. Wigg, E. Elias, R. Lambkin, C. O. Mills, J. S. Oxford, In vitro anti-HIV-1 virucidal activity of tyrosine-conjugated tri- and dihydroxy bile salt derivatives, *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 617–21.
 43. M. Kågedahl, P. W. Swaan, C. T. Redemann, M. Tang, C. S. Craik, F. C. Szoka, S. Øie, Use of the Intestinal Bile Acid Transporter for the Uptake of Cholic Acid Conjugates with HIV-1 Protease Inhibitory Activity, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 176–180.
 44. X. Zheng, J. E. Polli, Synthesis and in vitro evaluation of potential sustained release prodrugs via targeting ASBT, *Int. J. Pharm.* **2010**, *396*, 111–118.
 45. R. Rais, C. Acharya, G. Tririya, A. D. MacKerell, J. E. Polli, Molecular Switch Controlling the Binding of Anionic Bile Acid Conjugates to Human Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4749–4760.
 46. R. Rais, S. Fletcher, J. E. Polli, Synthesis and in vitro evaluation of gabapentin prodrugs that target the human apical sodium-dependent bile acid transporter (hASBT), *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 1184–1195.
 47. S. Tolle-Sander, K. A. Lentz, D. Y. Maeda, A. Coop, J. E. Polli, Increased Acyclovir Oral Bioavailability via a Bile Acid Conjugate, *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 40–48.
 48. W. Nienstedt, *Ihmisen fysiologia ja anatomia*, 15. uud. p. WSOY, Helsinki, 2004.
 49. S. Lee, K. Kim, T. S. Kumar, J. Lee, S. K Kim, D. Y. Lee, Y. Lee, Y. Byun, Synthesis and Biological Properties of Insulin–Deoxycholic Acid Chemical Conjugates, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 615–620.
 50. S. Son, S. Y. Chae, C. W. Kim, Y. G. Choi, S. Y. Jung, S. Lee, K. C. Lee, Preparation and Structural, Biochemical, and Pharmaceutical Characterizations of Bile Acid-Modified Long-Acting Exendin-4 Derivatives, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6889–6896.
 51. J. J. Criado, R. I. R. Macias, M. Medarde, M. J. Monte, M. A. Serrano, J. J. G. Marin, Synthesis and Characterization of the New Cytostatic Complex cis-Diammineplatinum(II)-Chlorocholyglycinate, *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 453–458.
 52. M. J. Almendral-Parra, A. Alonso, J. J. Criado, J. L. Manzano, E. Rodríguez-Fernández, Preparation and characterization of a new trans-platinum glycocholate complex, *Inorg. Chim. Acta.* **2011**, *376*, 651–654.
 53. Y. Li, Z. Zhang, Y. Ju, C-Q. Zhao, Design, Synthesis and Antitumor Activity of Dimeric Bile Acid-Amino Acid Conjugates, *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 414–418.

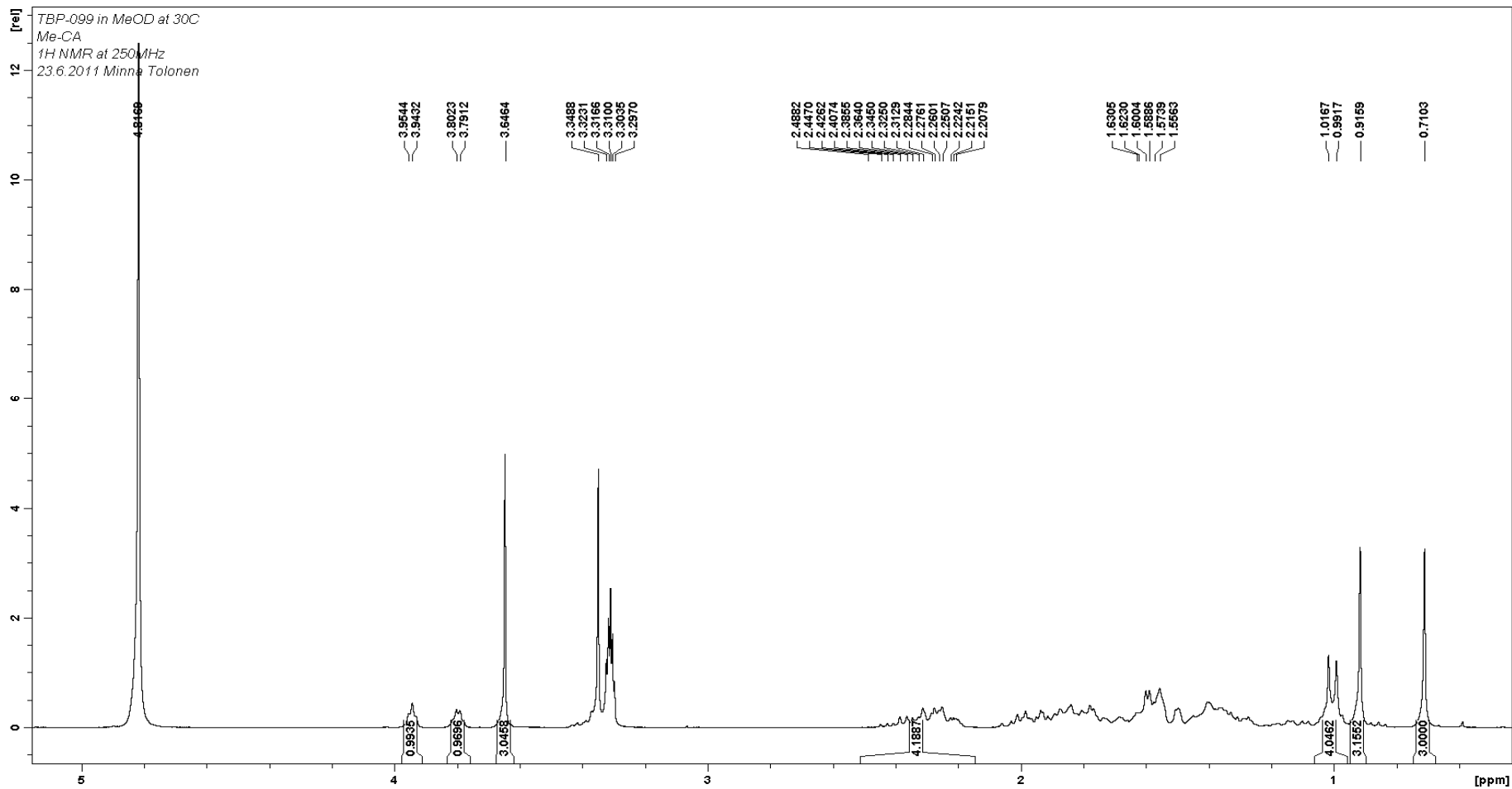
54. A. Roda, C. Cerré, A. Manetta, Synthesis and Physicochemical, Biological, and Pharmacological Properties of New Bile Acids Amidated with Cyclic Amino Acids, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2270–2276.
55. P. L. Anelli, L. Lattuada, V. Lorusso, G. Lux, A. Morisetti, P. Morosini, M. Serleti, F. Uggeri, Conjugates of Gadolinium Complexes to Bile Acids as Hepatocyte-Directed Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3629–3641.
56. P. A. Anelli, M. Brocchetta, C. De Haen, O. Gazzotti, L. Lattuada, G. Lux, G. Manfredi, P. Morosini, D. Palano, M. Serleti, M. Visigalli, F. Uggeri Blood pool agents for nuclear magnetic resonance diagnostics, **2000**, WO0038738.
57. V. Noponen, S. Bhat, E. Sievänen, E. Kolehmainen, Novel two-step synthesis of gold nanoparticles capped with bile acid conjugates, *Mat. Sci. Eng., C* **2008**, 1144–1148.
58. J. J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
59. J. Kasthuri, N. Rajendiran, Functionalization of silver and gold nanoparticles using amino acid conjugated bile salts with tunable longitudinal plasmon resonance, *Coll. Surf. B:* **2009**, *73*, 387–393.
60. G. L. Puleo, M. Masi, A. Iuliano, Synthesis of proline derivatives of bile acids and their evaluation as organocatalysts in the asymmetric direct aldol reaction, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1364–1375.
61. S. N. Bavikar, D. B. Salunke, B. G. Hazra, V. S. Pore, R. H. Dodd, J. Thierry, F. Shirazi, M. V. Deshpande, S. Kadreppa, S. Chattopadhyay, Synthesis of chimeric tetrapeptide-linked cholic acid derivatives: Impending synergistic agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5512–5517.
62. B. Ding, U. Taotofa, T. Orsak, M. Chadwell, P. B. Savage, Synthesis and Characterization of Peptide–Cationic Steroid Antibiotic Conjugates, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3433–3436.
63. P. E. Kish, Y. Tsume, P. Kijek, T. M. Lanigan, J. M. Hilfinger, B. J. Roessler, Bile Acid–Oligopeptide Conjugates Interact with DNA and Facilitate Transfection, *Mol. Pharm.* **2006**, *4*, 95–103.
64. C. A. Bodé, C. P. Muller, A. Madder, Validation of a solid-phase-bound steroid scaffold for the synthesis of novel cyclic peptidosteroids, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 702–708.
65. C. A. Bode, T. Bechet, E. Prodhomme, K. Gheysen, P. Gregoir, J. C. Martins, C. P. Muller, A. Madder, Towards the conformational mimicry of the measles virus HNE loop: design, synthesis and biological evaluation of a cyclic bile acid-peptide conjugate, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3391–3399.

66. E. Petzinger, A. Wickboldt, P. Pagels, D. Starke, W. Kramer, Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats, *Hepatology*. **1999**, *30*, 1257–1268.
67. J. Voipio, *Sappihappojen kuljettajaproteiinit - rakenne ja toiminta*, Pro Gradu - tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, orgaanisen kemian osasto, Jyväskylä, **2005**.
68. M. Feigel, R. Ladberg, S. Engels, R. Herbst-Irmer, R. Fröhlich, A Trefoil Knot Made of Amino Acids and Steroids, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5698–5702.
69. W. Kramer, S. Stengelin, K.-H. Baringhaus, G. Wess, Structure and specificity of the sodium- bile acid cotransport system from ileum and kidney, *Nova Acta Leopoldina* **1998**, *78*, 93–101.
70. F. Vögtle, O. Lukin, Knotting and Threading of Molecules: Chemistry and Chirality of Molecular Knots and Their Assemblies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1456–1477.
71. E. Virtanen and E. Kolehmainen, Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3385–3399.
72. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng (10.5.2012).
73. O. B. Ijare, B. S. Somashenkar, Y. Jadegoud, G. A. Nagana Gowda, ¹H and ¹³C NMR Characterization and stereochemical assignments of bile acids in aqueous media, *Lipids*, **2005**, *40*, 1031–1041.
74. Q. Guan, C. Li, E. J. Schmidt, J. S. Boswell, J. P. Walsh, G. W. Allman, P. B. Savage, Preparation and Characterization of Cholic Acid-Derived Antimicrobial Agents with Controlled Stabilities, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2837–2840.
75. Y. Yang, Y.-H. He, Z. Guan, W. D. Huang, A Highly Efficient Large-Scale Asymmetric Direct Intermolecular Aldol Reaction Employing L-Prolinamide as a Recoverable Catalyst, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2579–2587.

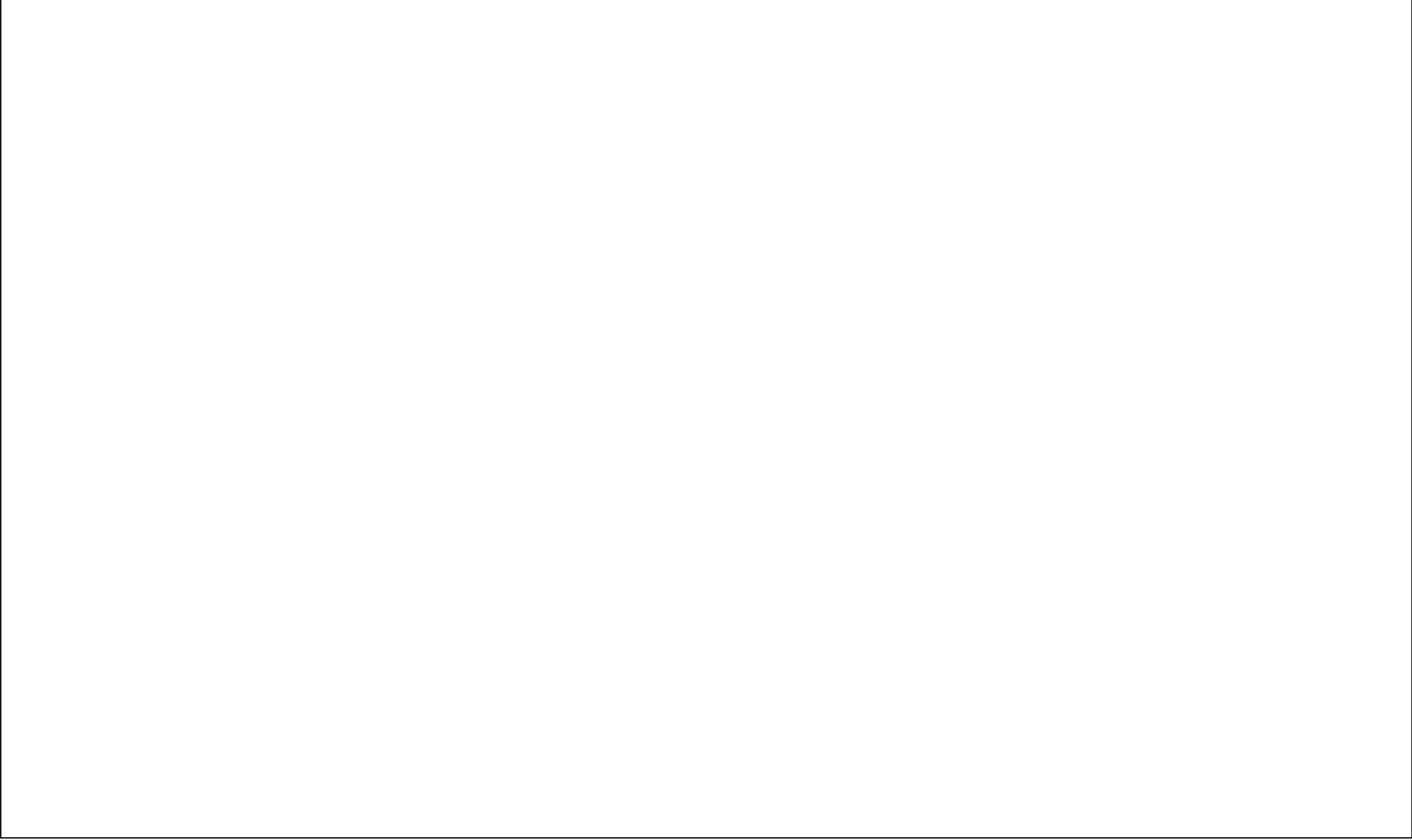
LIITTEET

1. Metyyli-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-oaatti (**125**)
LIITE 1.1 ^1H NMR –spektri
2. *N*-(2-Aminoetyyli)-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**128**)
LIITE 2.1 ^1H NMR -spektri
3. *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarboonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**130**)
LIITE 3.1 ^1H NMR -spektri
LIITE 3.2 ^{13}C NMR -spektri
LIITE 3.3 ESI-TOF -massaspektri
4. *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarboonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**131**)
LIITE 4.1 ^1H NMR -spektri
LIITE 4.2 ^{13}C NMR -spektri
LIITE 4.3 ESI-TOF -massaspektri
5. *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarboonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,12 α -dihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**132**)
LIITE 5.1 ^1H NMR -spektri
LIITE 5.2 ^{13}C NMR -spektri
LIITE 5.3 ^{13}C DEPT-135 NMR -spektri
LIITE 5.4 PFG ^1H , ^{13}C HMBC -spektri
LIITE 5.5 PFG ^1H , ^{13}C HMQC -spektri
LIITE 5.6 ESI-TOF -massaspektri
6. *N*-{*N'*-[*N''*-(*tert*-Butoksikarboonyyli)-L-prolinamidi]etyyli}-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**133**)
LIITE 6.1 ^1H NMR -spektri
LIITE 6.2 ^{13}C NMR -spektri
7. *N*-[(*N'*-L-Prolinamidi)etyyli]-3 α -hydroksi-5 β -kolan-24-amidi (**134**)
LIITE 7.1 ^1H NMR -spektri

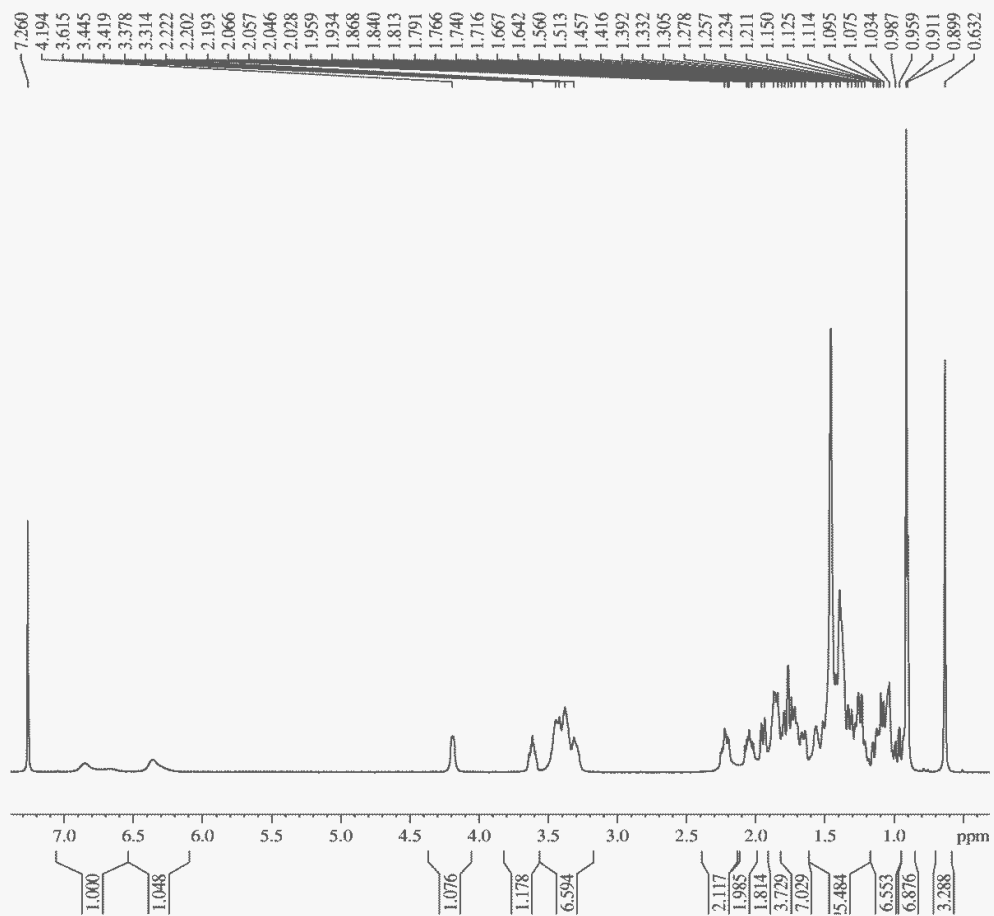
LITE 1.1



LITE 2.1



LITE 3.1



TBP-097-4 in CDCl3 at 30 C
1H NMR at 500 MHz with BBI
02.07 2011 Minna Tolonen/EK

```

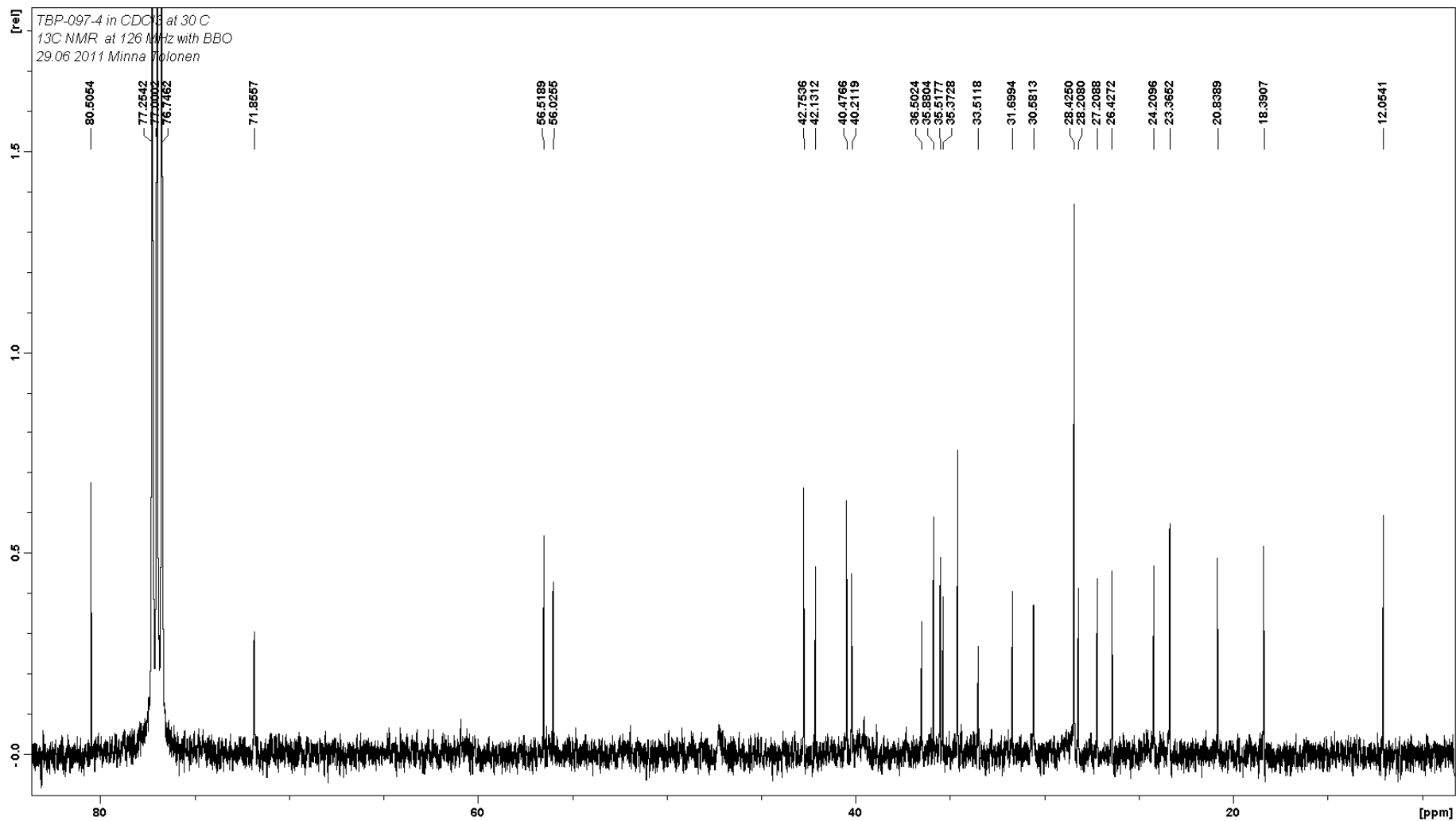
Current Data Parameters
NAME          TBP-087-4
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20110702
Time          9.49
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Multinucl
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            4
DS            0
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.122266 Hz
AQ            4.0894966 sec
RG            80.6
DW            62.400 usec
DE            89.25 usec
TE            303.2 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1           1H
P1             8.40 usec
PL1            -6.00 dB
SFO1           500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            500.1300130 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.10 Hz
GB            0
PC            1.50
    
```

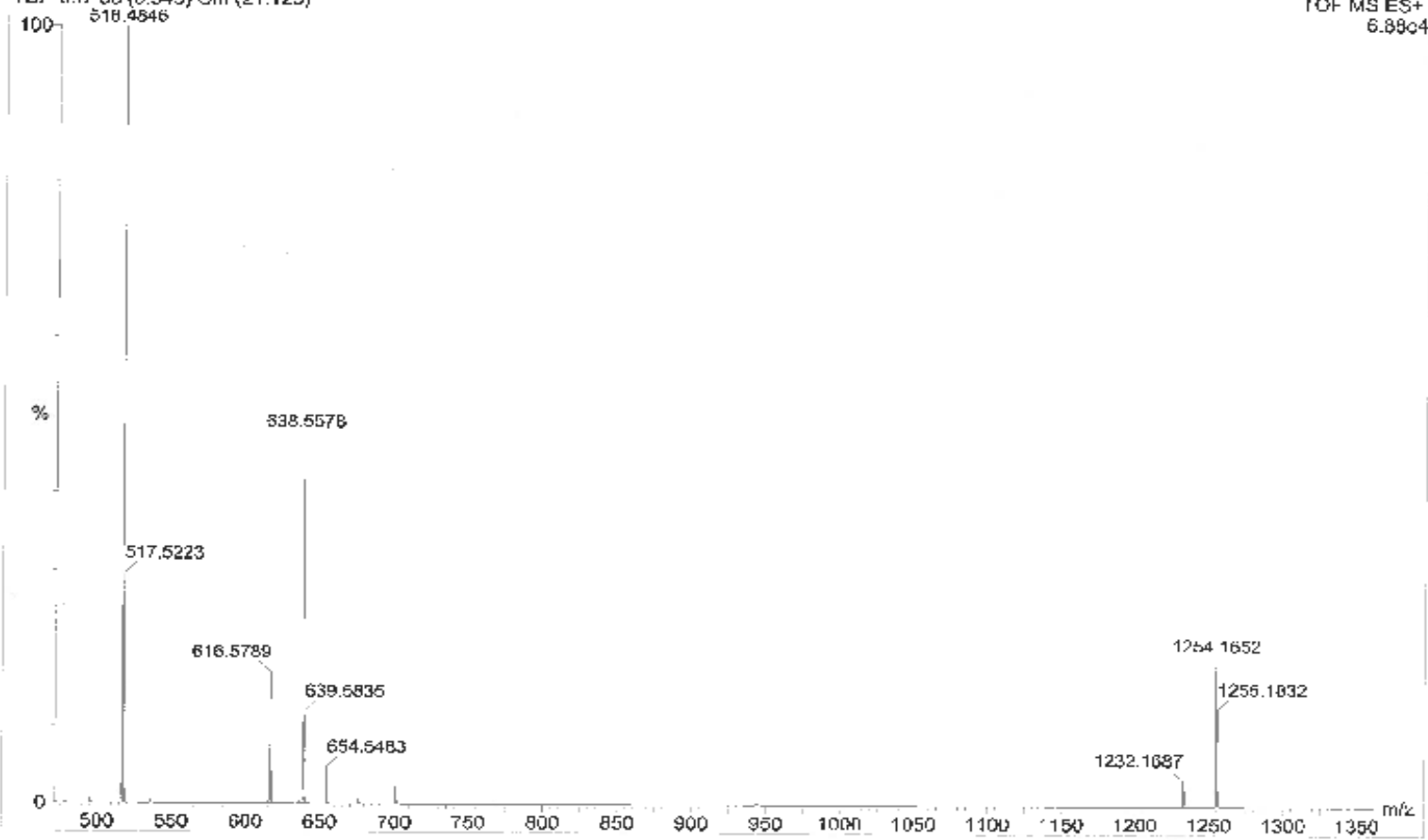
LIITE 3.2



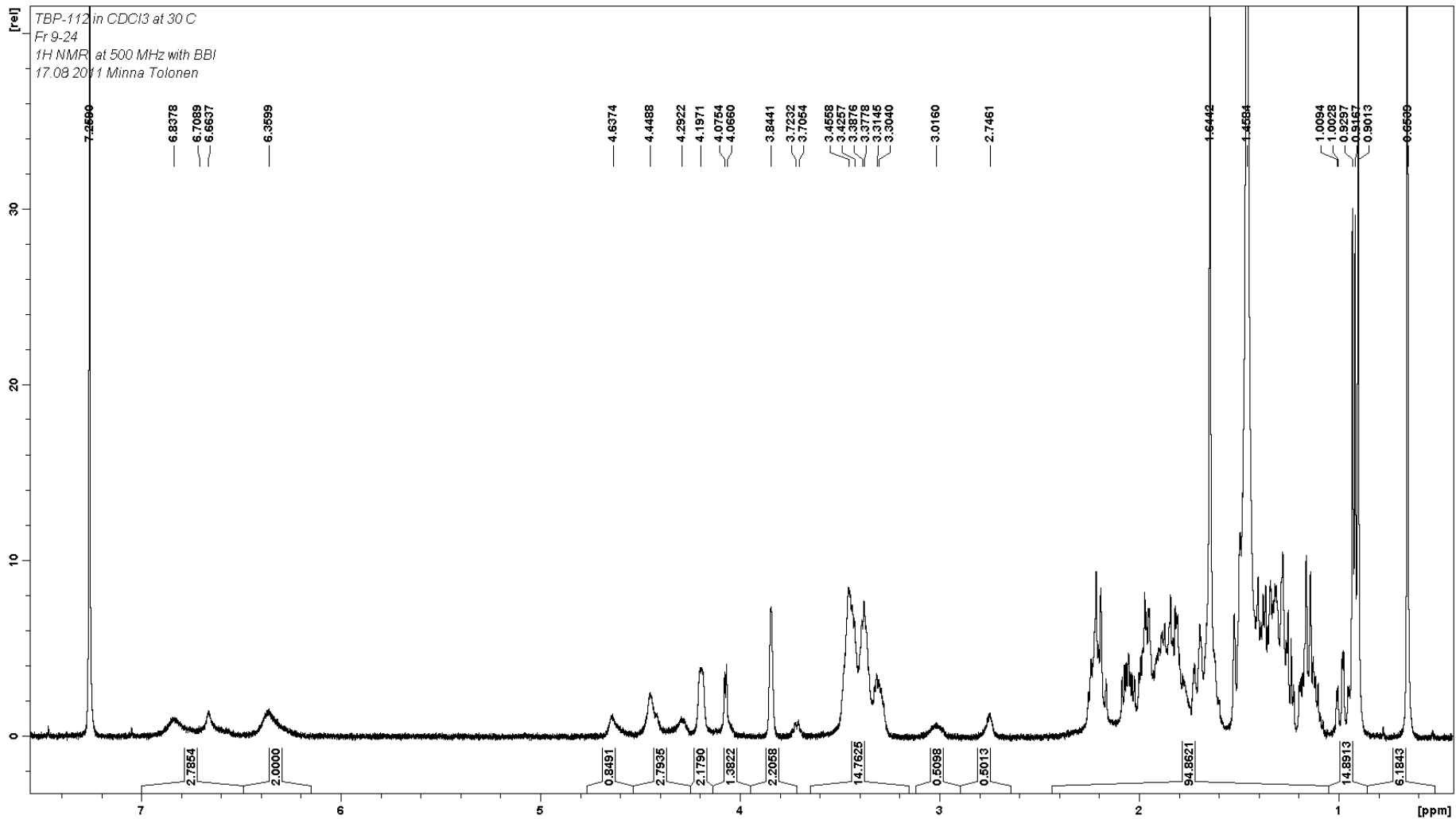
TBP-097 LCA-AetA-Boc Prolini

TBP-097 35 (0.349) Cm (21:125)

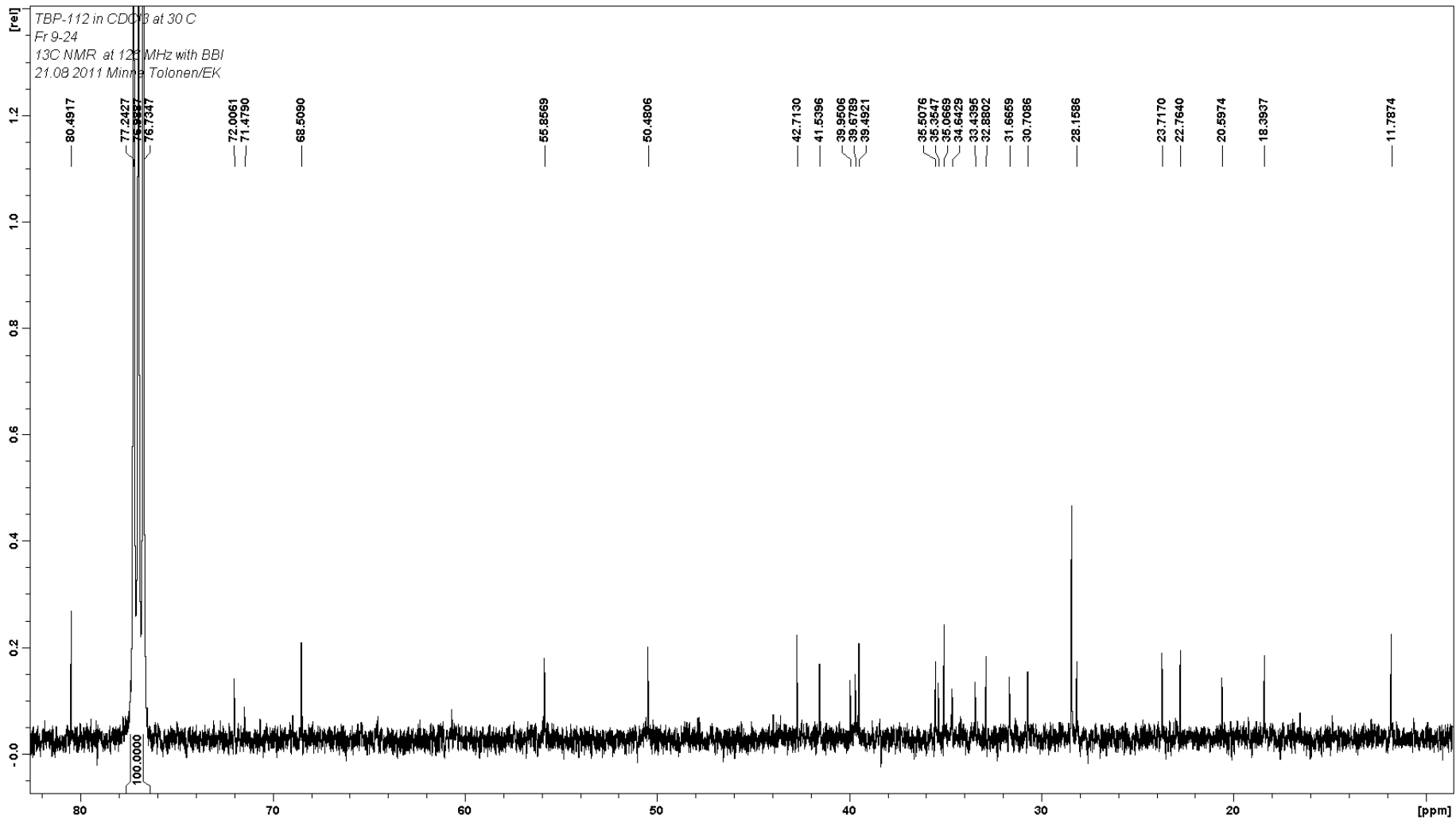
05-Aug-2011
TOF MS ES+
6.88c4



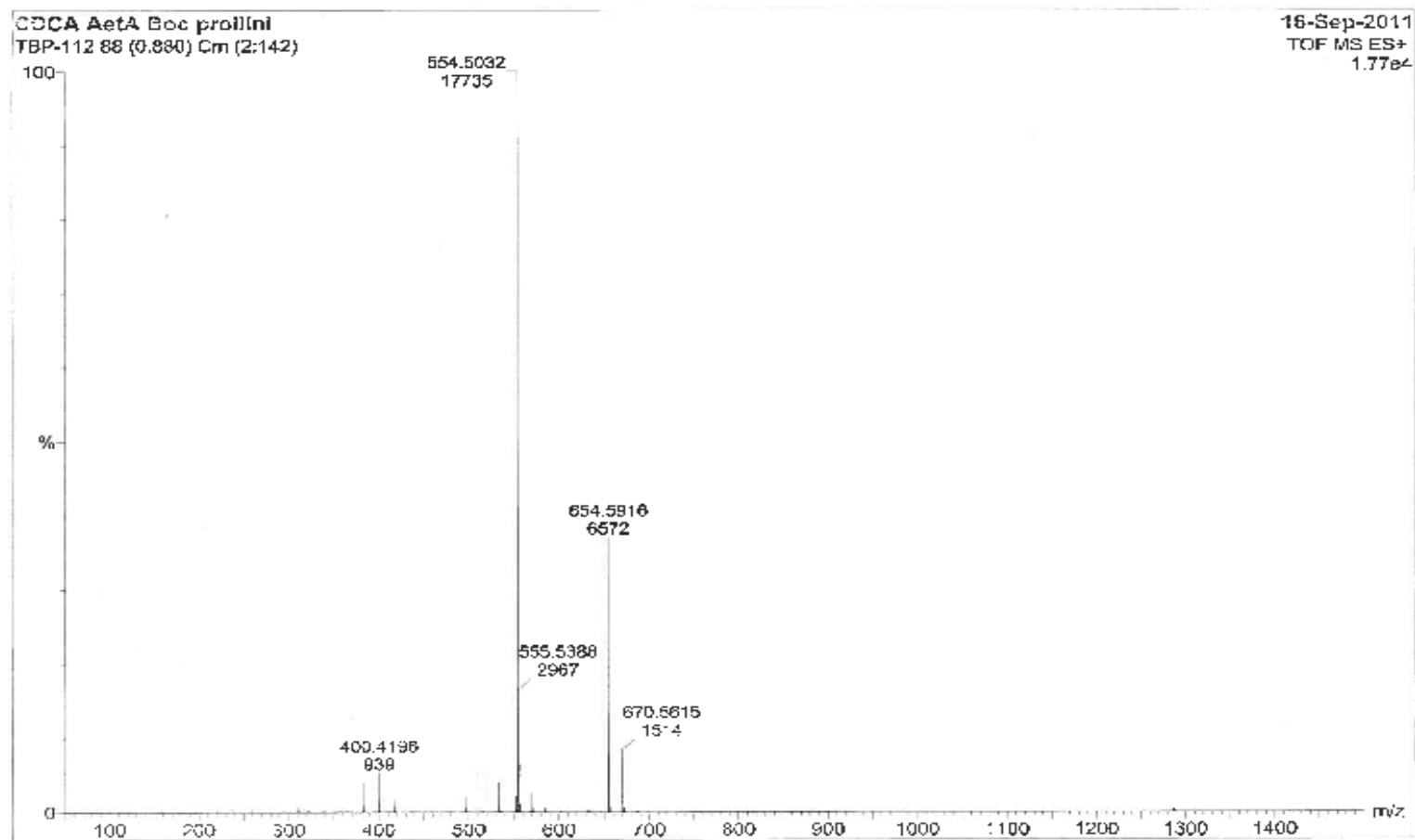
LITE 4.1



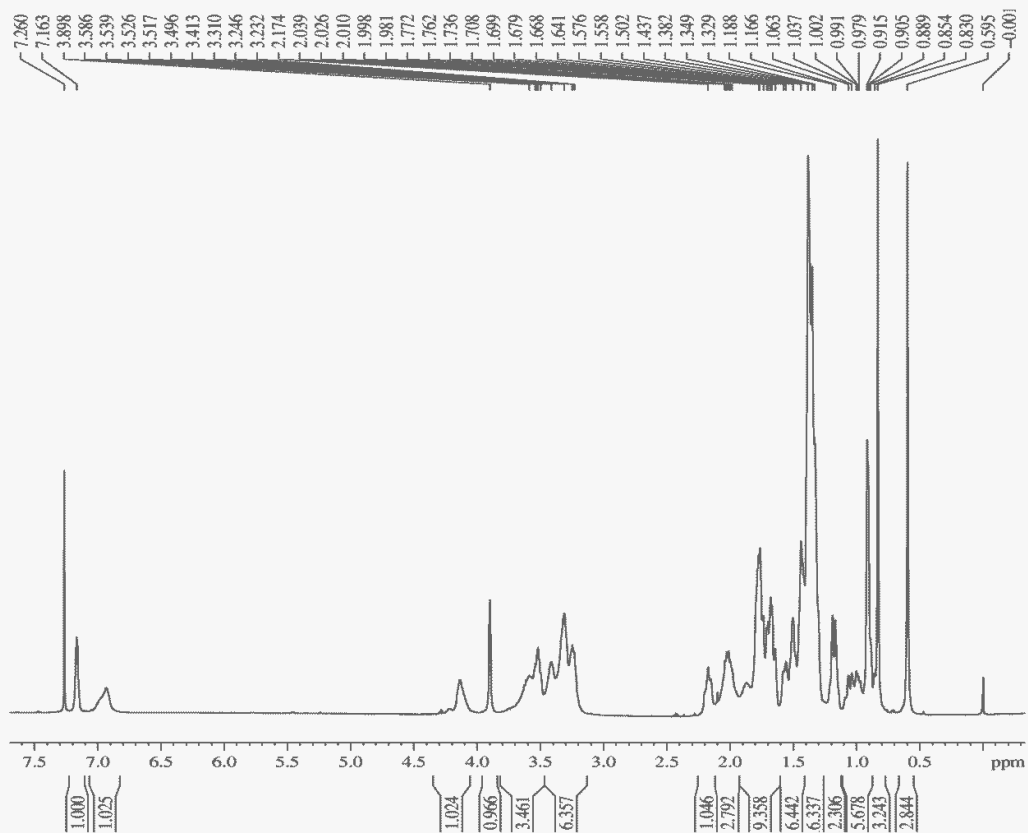
LIITE 4.2



LIITE 4.3



LIITE 5.1



TBP-111 in CDCl3 at 30 C
Fr 9-33 (väkevampi näyte)
1H NMR at 500 MHz with BBO
16.08 2011 Minna Tolonen

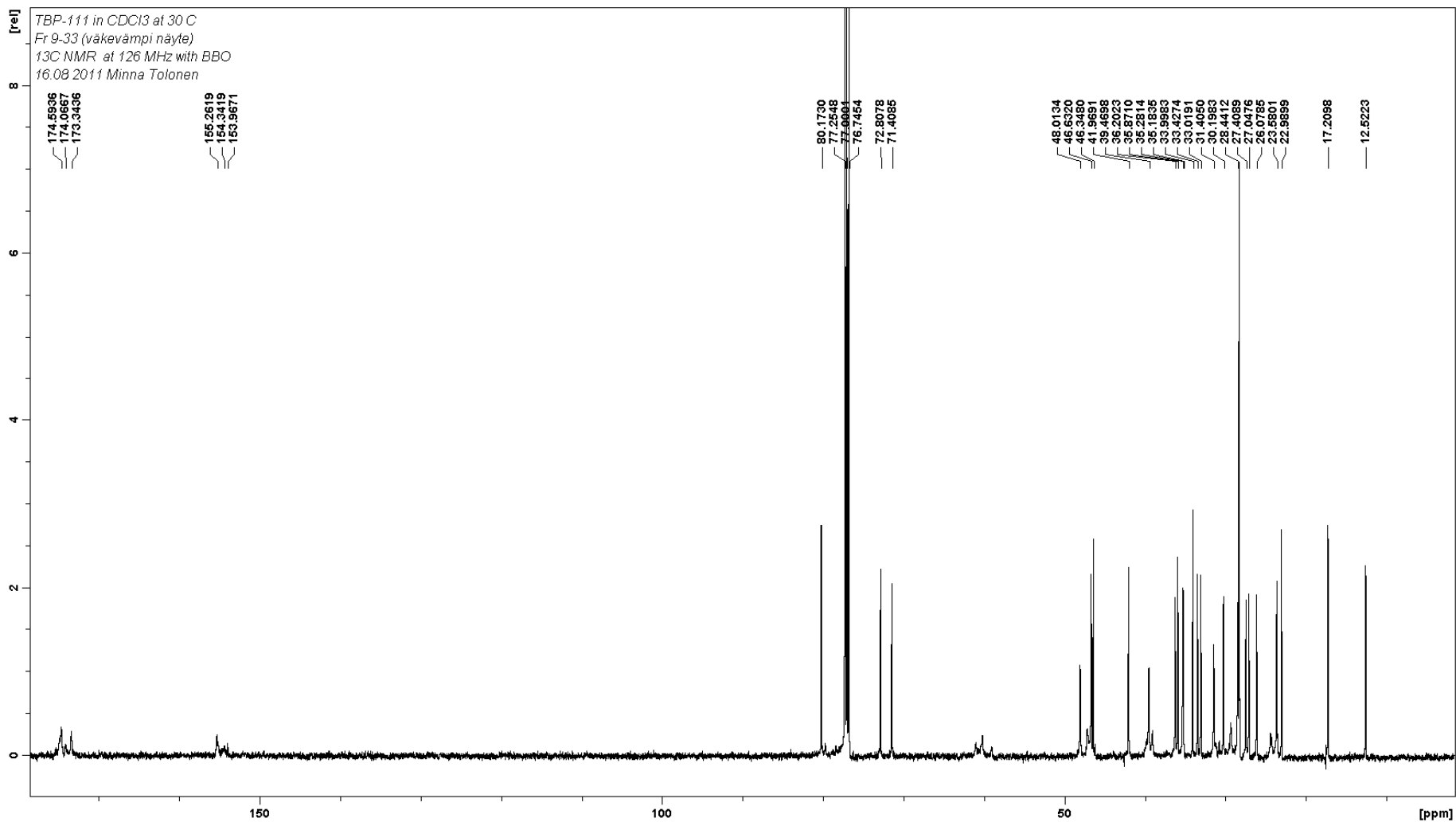
Current Data Parameters
NAME TBP-111
EXPNO 5
PROCNO 1

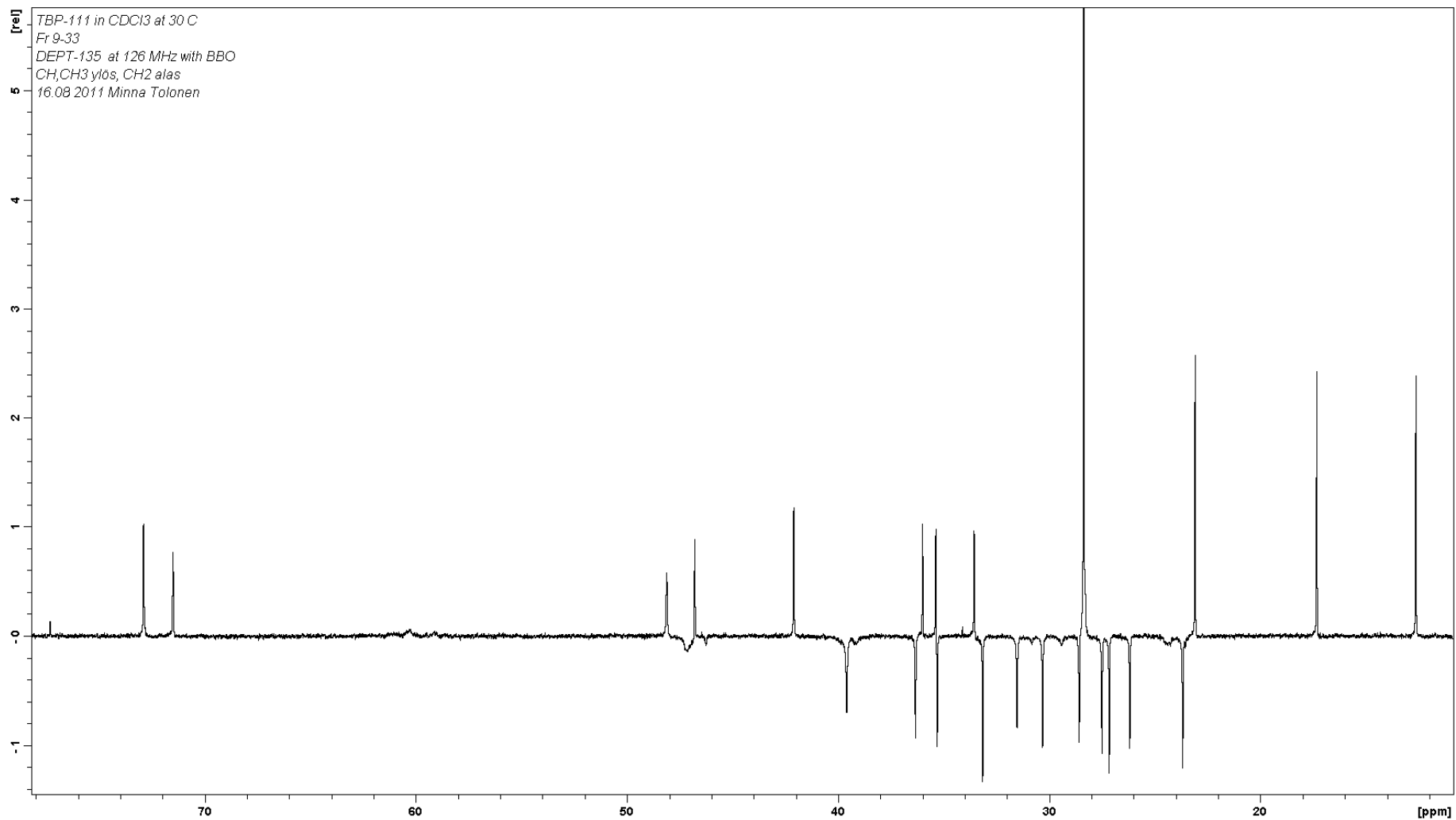
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110816
Time 10.23
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.122266 Hz
AQ 4.0894966 sec
RG 18
DW 62.400 usec
DE 89.25 usec
TE 303.2 K
D1 1.0000000 sec
D10 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 8.40 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

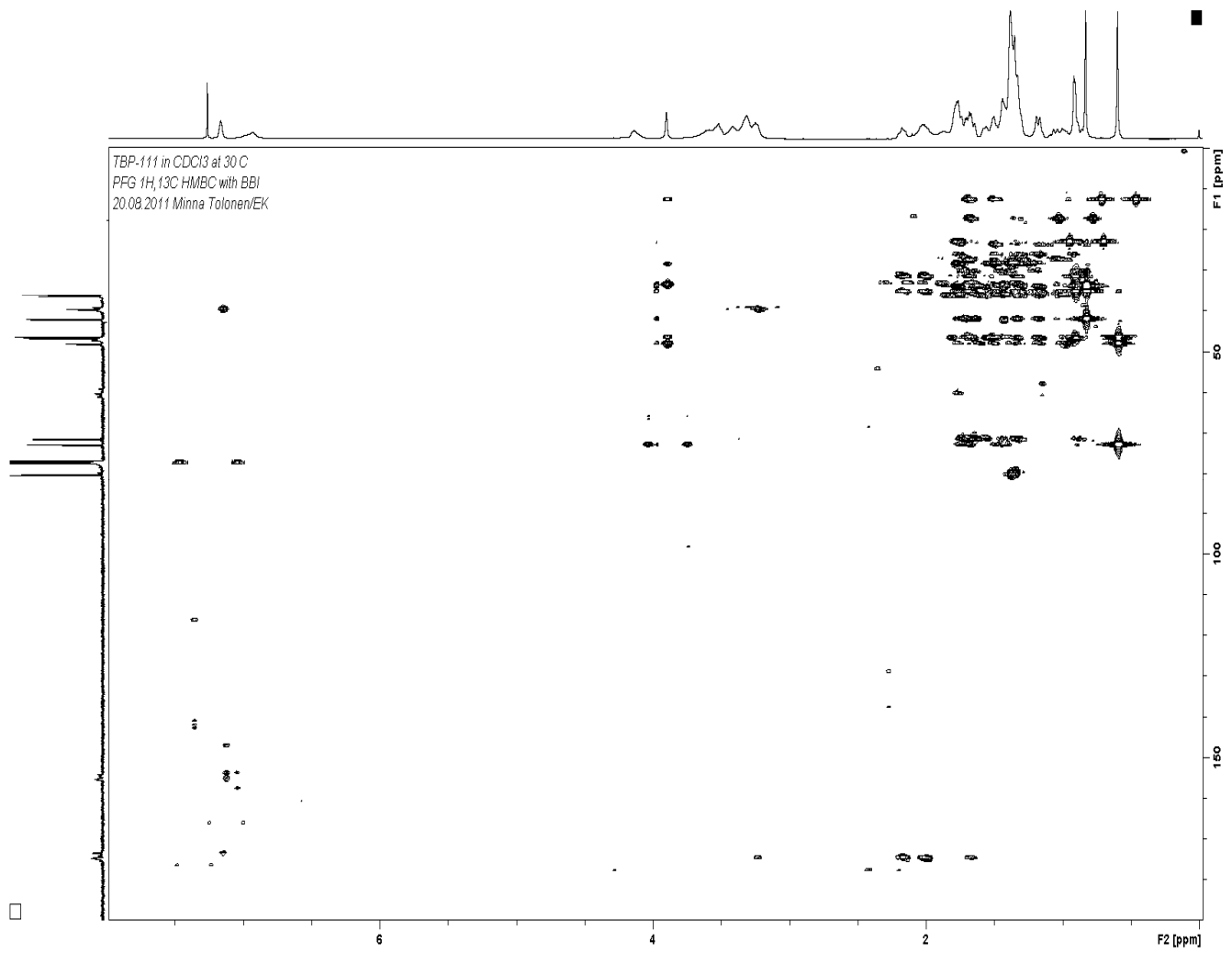
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300128 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.50

LIITE 5.2

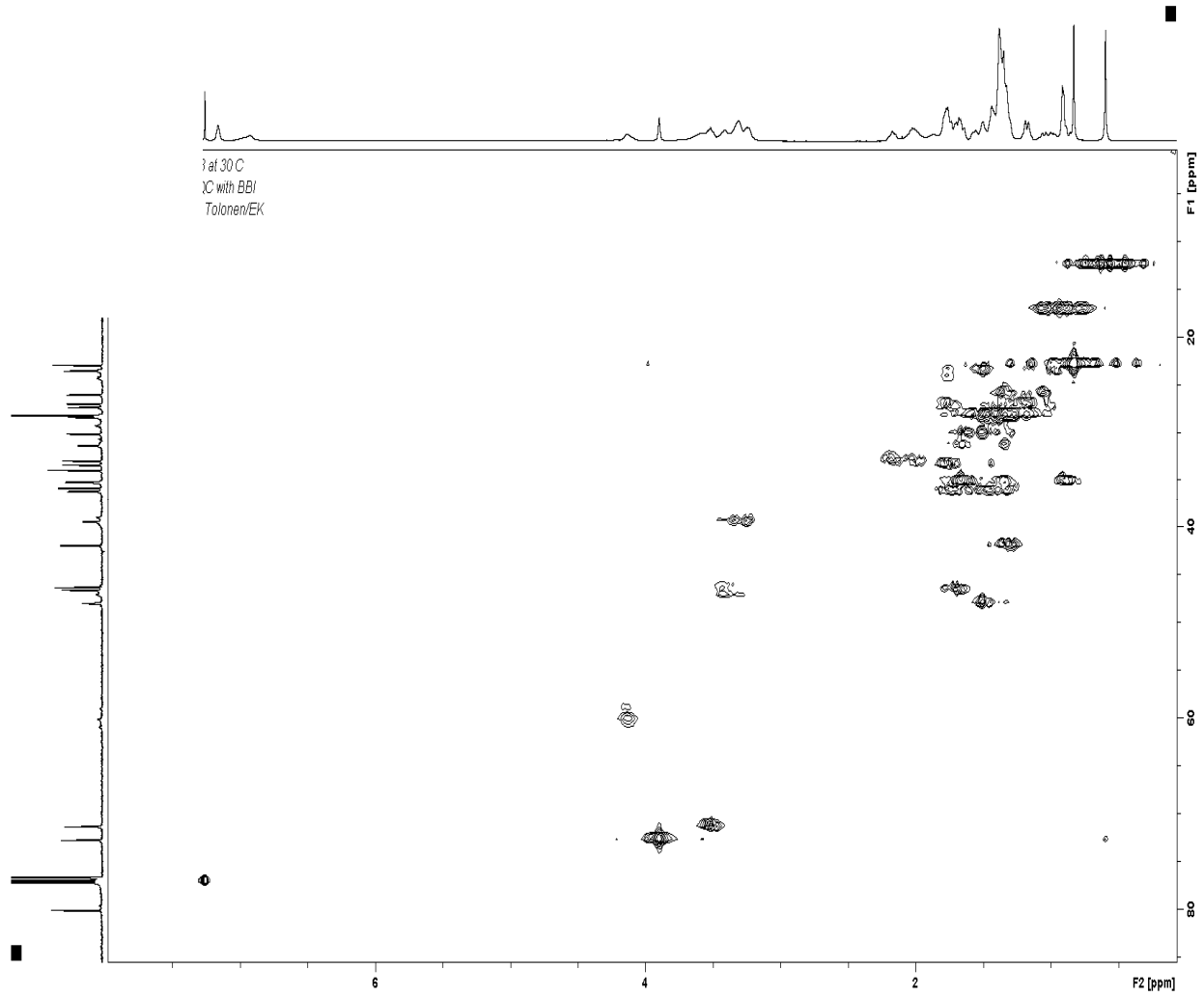




LIITE 5.4



LITE 5.5



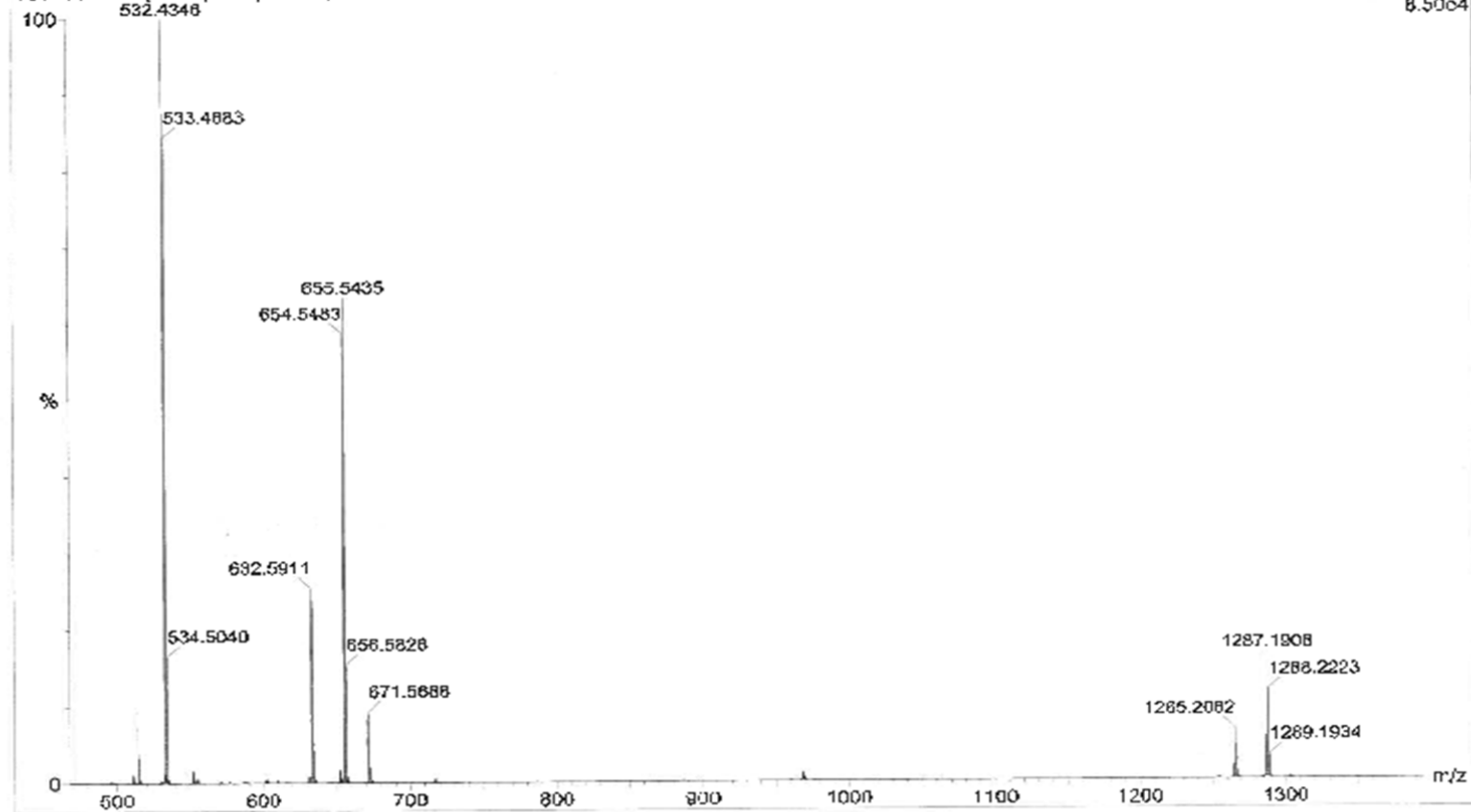
TBP-111 DCA-AcEtA-Boc Prolini

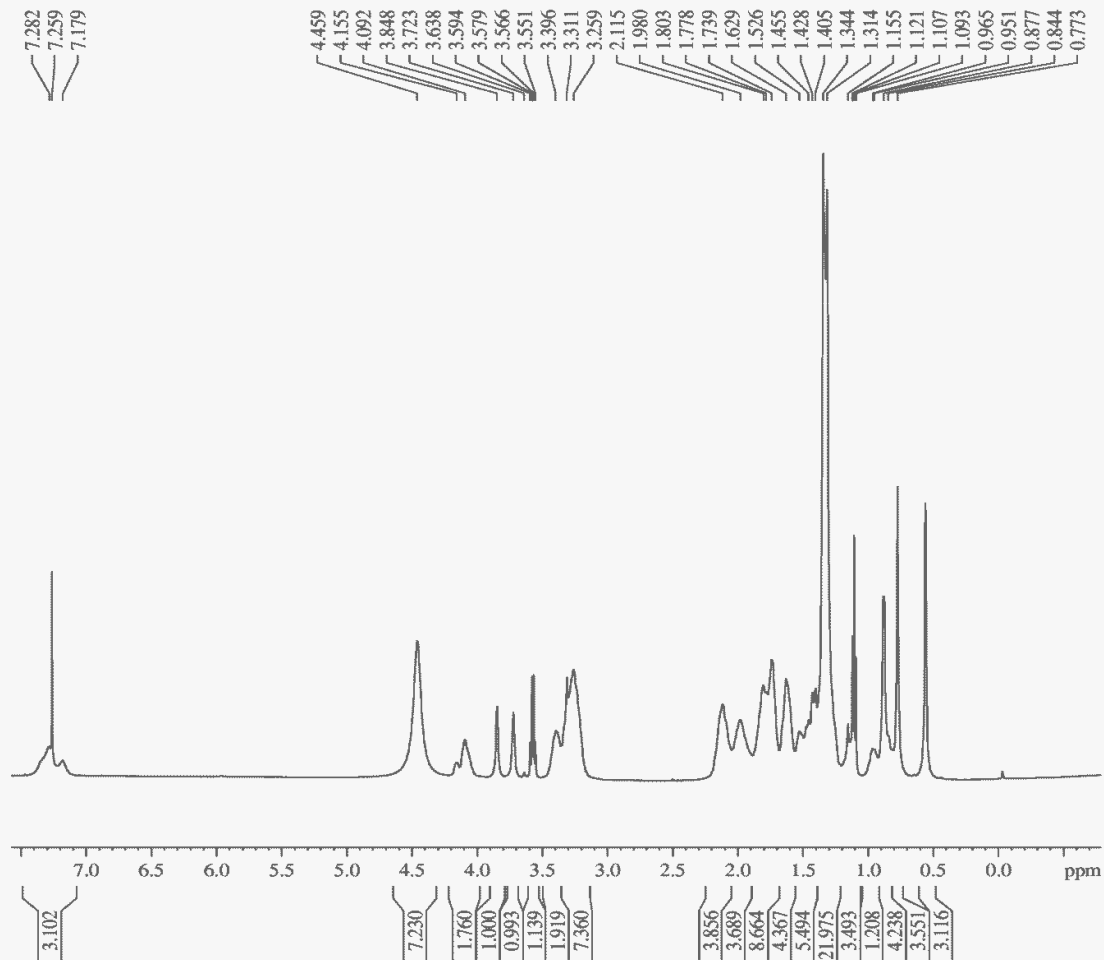
TBP-111 106 (1.060) Cm (25:123)

05-Aug-2011

TOF MS ES+

8.5004





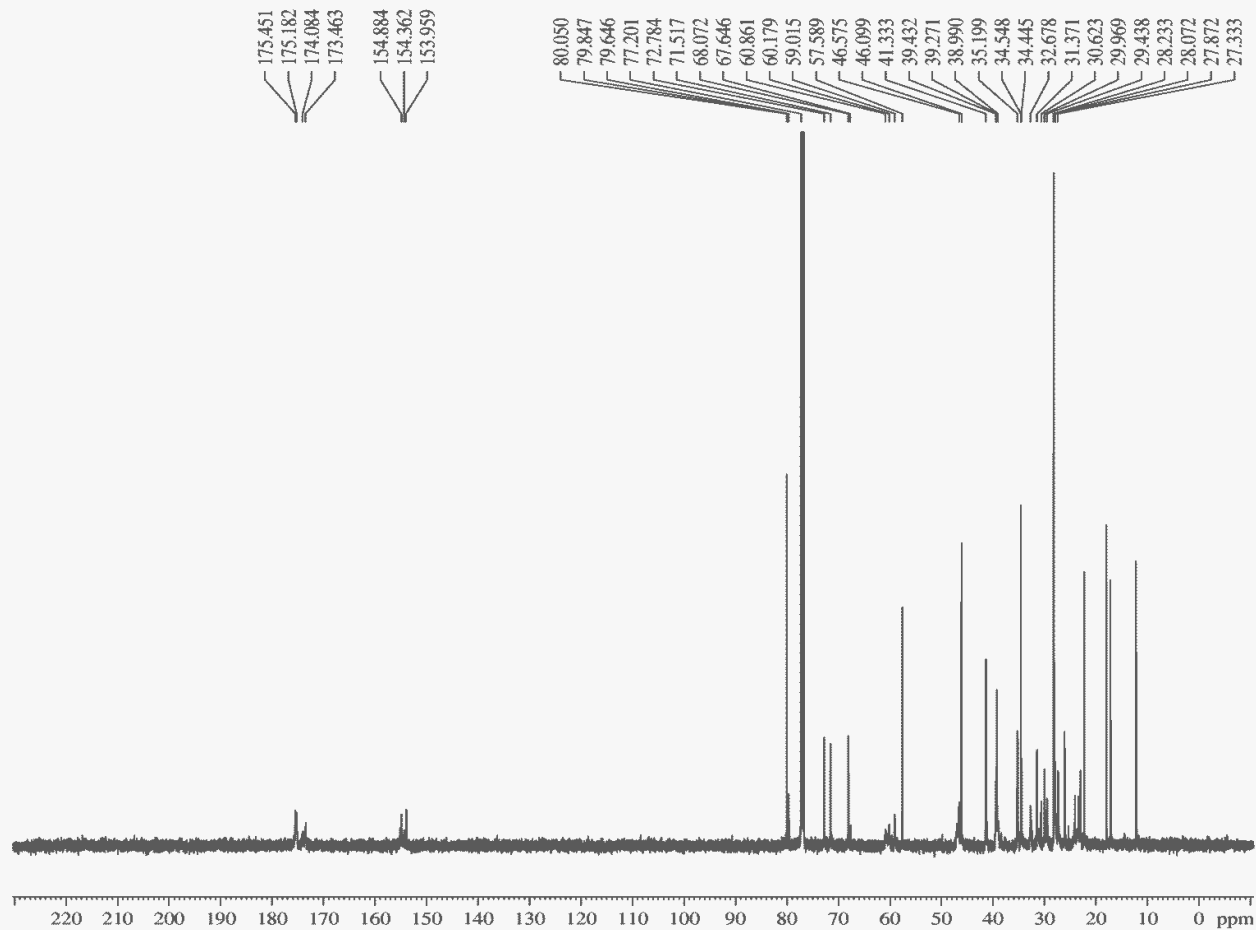
TBP-105+106 in CDCl3 at 30 C
 Fr 12-45 (väkevampi näyte)
 1H NMR at 500 MHz with BBI
 16.08 2011 Minna Tolonen

Current Data Parameters
 NAME TBP-105&106
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110816
 Time 11.01
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.122266 Hz
 AQ 4.0894966 sec
 RG 11.3
 DW 62.400 usec
 DE 89.25 usec
 TE 303.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 8.40 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 500.1300115 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.50



TBP-105+106 in CDCl3 at 30 C
 Fr 12-45 (väkevampi näyte)
 13C NMR at 126 MHz with BBO
 16.08 2011 Minna Tolonen

Current Data Parameters
 NAME TBP-105&106
 EXPNO 102
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110816
 Time_ 10.40
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 394
 DS 0
 SWH 30303.031 Hz
 FIDRES 0.462388 Hz
 AQ 1.0813940 sec
 RG 4096
 DW 16.500 usec
 DE 6.00 usec
 TE 303.2 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TD0 10240

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 11.50 usec
 PL1 -4.00 dB
 SFO1 125.7716224 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 13.47 dB
 PL13 120.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 125.7578100 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

LIITE 7.1

