

Sappihappopohjaiset polymeerit biolääketieteellisissä sovelluksissa

Kandidaatintutkielma ja -projekti

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian osasto

14.5.2014

Jari Ahonen

TIIVISTELMÄ

Tutkielman kirjallisessa osassa esitellään sappihappoja ja niistä syntetisoituja sappihappopohjaisia polymeerejä sekä tutustutaan niiden sovelluskohteisiin. Tutkielman lähtökohtana on erityisesti selvittää sappihappopohjaisten polymeerien käyttöä biolääketieteessä. Tämän alan sovelluskohteita ovat muun muassa sappihappopohjaisten polymeerien käyttö lääkeaineiden kuljettajina.

Tutkielman kokeellisessa osassa esitellään sappihappojen alkyylimidijohdannaisten valmistamista ja puhdistamista. Kokeellisen osan lähtökohtana oli erityisesti selvittää litokoolihapon spermidiiniamidin ja etyylimidin valmistamista. Tämän tutkielman kokeellisessa osassa saatiin valmistettua ja puhdistettua litokoolihapon etyylimidia, jota voidaan käyttää tulevilla tutkimuksilla, kuten gelatointikokeissa.

ESIPUHE

Tutkielman kirjallinen ja kokeellinen osa tehtiin orgaanisen kemian osastolla kevätlukukauden 2014 aikana.

Lähdemateriaalina on käytetty Google Scholar -hakukonetta sekä SciFinder-tietokantaa. Hakusanoina käytettiin *bile acid polymer*, *bile acid medicine*, *bile acid biomedicine*, *bile acid pharmaceutical* sekä *bile acid dental*. Hauissa pyrittiin keskittymään 2000-luvulla ilmestyneisiin tutkimusartikkeleihin. Lisäksi hyödynnettiin tietoa, että professori Julian Zhu (X. X. Zhu) on työskennellyt aiheen parissa.

Kandidaatintutkielmani kirjallisen ja kokeellisen osan ohjaajana toimi akatemiaturkija, dosentti Elina Sievänen, jota kiitän mielenkiintoisesta aiheesta.

Kiitokset kuuluvat myös ystäväilleni ja perheelleni, jotka ovat kannustaneet ja tukeneet minua etenemään opinnoissani.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	i
ESIPUHE.....	ii
SISÄLLYSLUETTELO.....	iii
LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT.....	v

KIRJALLINEN OSA

1. JOHDANTO.....	1
2. SAPPIHAPOT.....	1
3. SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT.....	4
4. SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT JA BIOLÄÄKETIEDE.....	5
4.1 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT LÄÄKEAINEIDEN ANNOSTELIJOINA JA KULJETTAINA.....	7
4.1.1 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYANHYDRIDIT.....	8
4.1.2 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYESTERIT.....	9
4.1.3 SAPPIHAPPOPOHJAISET AMIDIT.....	10
4.2 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT TÄYTEAINEENA HAMMASLÄÄKETIETEESSÄ.....	11
5. YHTEENVETO.....	12

KOKEELLINEN OSA

6. TYÖN TARKOITUS.....	15
7. MENETELMÄT, LAITTEET JA KÄYTETYT REAGENSsit.....	15
8. SYNTEESIT.....	16
8.1 METYYLILITOKOLAATTI.....	17
8.2 LITOKOOLIHAPON SPERMIDIINIAMIIDI.....	17
8.3 LITOKOOLIHAPON ETYYLIAMIIDI.....	18
9. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	20

10. YHTEENVETO.....	21
11. SYNTEESIOHJEET.....	22
12. SYNTETISOIDUT MOLEKYYLIT.....	25
13. KIRJALLISUUSLUETTELO.....	27
LIITTEET	

LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT

Amfipaattisuus	Toinen puoli molekyylistä on hydrofiilinen ja toinen hydrofobinen
Enantioselektiivisyys	Reaktio, jossa tuotetaan vain toista peilikuvaisomeeriä
Hydrolyyttinen aine	Vettä lisättäessä yhdiste hajoaa takaisin lähtöaineiksi
FT-IR-spektroskopia	Fourier-muunnosinfrapunapektroskopia
SE-kromatografia	Molekyylin kokoluokkaa erotteleva kromatografia
ED-ROP	Entropian ajama renkaanavauspolymerointi
Grubbsin katalyytti	Eräs metallikarbeenikompleksi
NMR-spektroskopia	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
in vitro	Koe suoritetaan elävän organismin ulkopuolella
Kolorimetria	Liuoksen läpi kulkeneen valon absorptiota mittaava menetelmä

1. JOHDANTO

Tässä tutkielmassa perehdytään sappihappoihin ja niistä syntetisoituihin sappihappopohjaisiin polymeereihin sekä esitellään hieman niiden ominaisuuksia. Lisäksi tutustutaan biolääketieteeseen ja sappihappopohjaisten polymeerien hyödyntämiseen siinä.

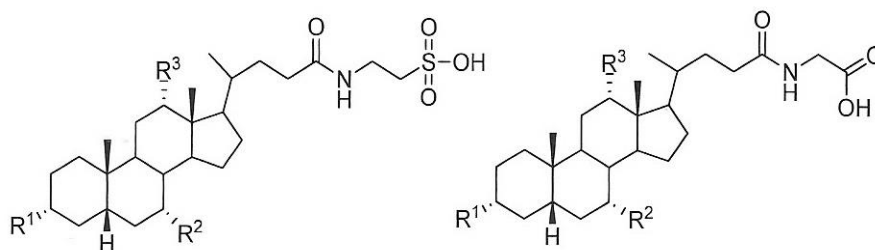
Sappihapot ovat mielenkiintoinen yhdisteryhmä, koska ne ovat monimuotoisia ja niitä esiintyy paljon luonnossa. Tarkasteltaessa esimerkiksi ihmisen elimistöä sappihapot ovat osa aineenvaihduntaa ja kolesterolikataboliaa, jonka tehtävänä on kolesterolin poistaminen elimistöstä virtsan ja ulosteen mukana. Sappihapot esiintyvät yleensä tauriini- ja glysiinikonjugaatteina, joita on vuosien saatossa tutkittu paljon. Sappihappojen steroidirungossa on monia reaktiivisia kohtia, jotka voivat muodostaa sidoksia esimerkiksi toisten sappihappojen kanssa. Niitä on rakenteensa puolesta mahdollisuus käyttää monenlaisissa sovelluksissa, kuten biolääketieteellisissä.

Biolääketiede on melko uusi ja monitieteinen tutkimusala, joka etsii luonnontieteilijöiden ja insinöörien suunnittelutaitojen perusteella parempia menetelmiä sairauksien hoitoon. Tavoitteena on yhä yksilöllisempien hoitojen ja reseptorispesifien lääkeaineiden kehitys. Sappihapot ovat biolääketieteen kannalta lupaava yhdisteryhmä, koska niillä on monipuoliset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet.

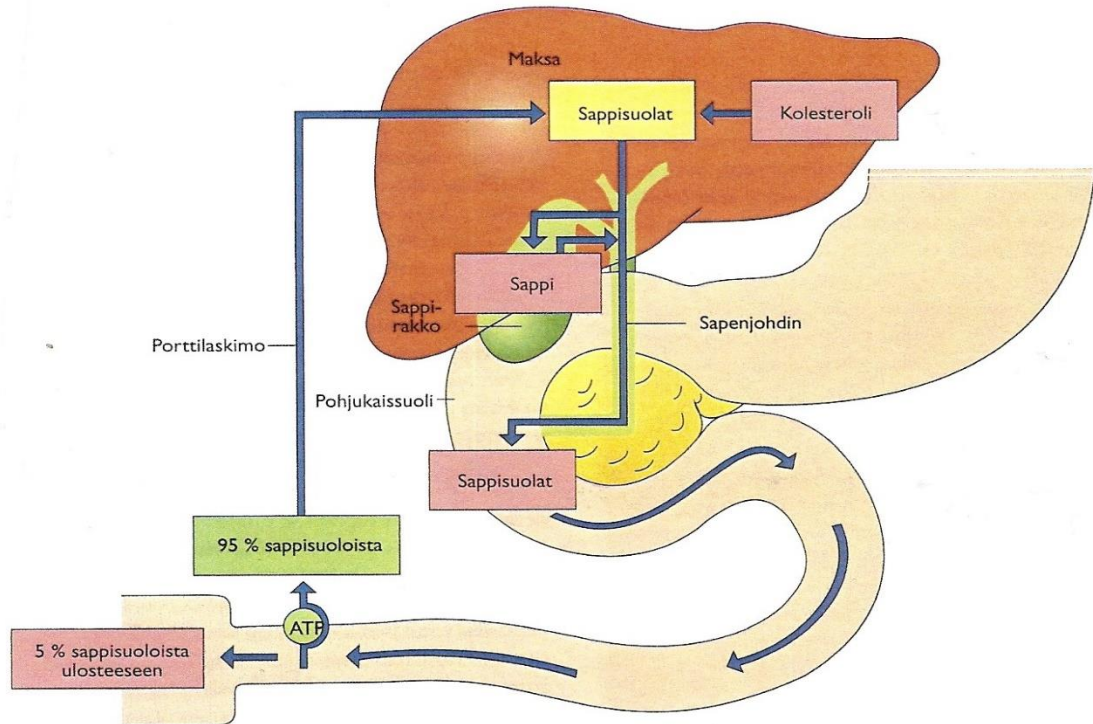
2. SAPPIHAPOT

Sappihapot kuuluvat laajaan steroidien perheeseen.^{1,2,3} Sappihapot esiintyvät elimistössä yleensä vesiliukoisina glysiini- tai tauriinikonjugaatteina, jolloin ne voidaan varastoida sappirakkoon. Sappihappojen historia alkaa 1900-luvun alusta⁴, jolloin sappihappoja eroteltiin ensimmäistä kertaa sapesta. Nykyisen kaltainen sappihappotutkimus alkoi 1950-luvulla, jolloin niitä alettiin systemaattisesti eristää ja karakterisoida. Sappihappoja kuitenkin nimettiin, ennen kuin niiden rakenne oli tiedossa, mistä johtuu niiden nimeämiseen liittyvä monimutkaisuus. Nykyisten tutkimusten avulla on saatu tietoa sappihappojen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista sekä soveltuvuudesta esimerkiksi materiaalikemian ja biolääketieteen raaka-aineiksi.

Solujen aineenvaihduntareittejä tarkasteltaessa sappihapot ovat osa kolesterolikataboliaa, sillä ne osallistuvat kolesterolin poistamiseen elimistöstä.¹ Ihmisen elimistössä esiintyvät sappihapot voidaan jaotella rakenteen ja toiminnan perusteella primaarisiin sekä sekundaarisiin sappihappoihin. Primaarisia sappihappoja ovat koolihappo ja kenodeksikoolihappo. Kyseiset sappihapot muodostetaan osana enterohepaattista kiertoa maksassa, jossa niiden lähtöaineena toimii kolesteroli. Primaariset sappihapot kuljetetaan glysiini- ja tauriinikonjugaattien (kuva 1) avulla sappirakkoon, jossa ne väkevöidään ja varastoidaan. Kun primaariset sappihapot altistuvat suolessa bakteereille, niistä muotoutuu sekundaarisia sappihappoja. Tällöin niistä muodostuu deoksikoolihappoa ja litokoolihappoa. Enterohepaattisessa kierrossa sappihapot kiertävät reittiä suolisto–porttilaskimo–maksa–sappi–suolisto siten, että rasvaisen ruuan vapauduttua mahalaukusta ohutsuoleen alkaa samalla sappea erittyä sappirakosta. Kun rasva-aineet ovat imeytyneet suolistossa, suurin osa vapautuneista sappihapoista kulkeutuu takaisin sappirakkoon. Osa sappihapoista kuitenkin poistuu virtsan ja ulosteen mukana, jolloin myös kolesterolia poistuu elimistöstä. Tämä kierto tapahtuu yleensä 6–15 kertaa päivässä (kuva 2).



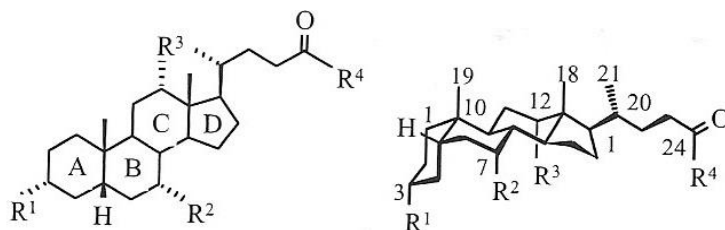
Kuva 1: Sappihappojen tauriini- ja glysiinikonjugaatit.⁵



Kuva 2: Enterohepaattinen kierto.⁶

Sappihapoilla on myös hormonaalisia tehtäviä, koska ne toimivat maksassa viestimolekyyleinä ja aktivoivat muun muassa tumahormonireseptori FXR:n toimintaa.¹ Lisäksi ne edistävät rasvaliukoisten vitamiinien imeytymistä ohutsuolessa. Sappihappojen esiintyminen kehossa on tarkoin säädeltyä ja tapahtuu erilaisten entsyymien avulla, jotka osallistuvat esimerkiksi sappihappojen aineenvaihduntaan. Sappihappojen liiallinen tai liian vähäinen erityys voi johtaa erilaisiin aineenvaihdunnallisiin ongelmiin, kuten ravintoaineiden imeytymishäiriöihin.

Sappihappojen rakenne koostuu kolmesta kuusirenkaasta ja yhdestä viisirenkaasta, joita merkitään yleisesti kirjaimilla A–D (kuva 3).¹ Lisäksi sappihapoilla voi olla lyhyt sivuketju. Sappihappojen steroidirungossa on monia reaktiivisia kohtia, jotka voivat muodostaa toisten sappihappojen kanssa esimerkiksi esterisidoksen tai anhydridin. Sappihappojen monimuotoisuus selittyy osin myös niiden amfipaattisuudella, eli niiltä löytyy sekä hydrofiilinen eli veden kanssa vuorovaikuttava osa sekä vettä hylkivä eli hydrofobinen osa. Tällöin sappihapot voivat vuorovaikuttaa solukalvon eri osien kanssa.



Nimi	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Kolaanihappo	H	H	H	OH
Koolihappo	OH	OH	OH	OH
Kenodeoksikoolihappo	OH	OH	H	OH
Deoksikoolihappo	OH	H	OH	OH
Litokoolihappo	OH	H	H	OH
Glykokolaatti	OH	OH	OH	NHCH ₂ CO ₂ ⁻
Taurokolaatti	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻

Kuva 3: Tyypillisten sappihappojen rakenteet ja nimet.⁷

3. SAPPIHAPPOHOJAISET POLYMEERIT

Synteettinen kemia tarvitsee molekyyliä, jotka tunnistavat ja sitovat toisiaan.^{8,9,10} Suunnittelun kriteereinä on, että molekyylillä tulisi olla selkeä geometria ja mahdollisuus muodostaa erilaisia konformaatioita. Valmistettavalla molekyylillä pitäisi olla myös hyvät termodynaamiset ominaisuudet, ja sen tulisi olla helposti muokattavissa. Lisäksi raaka-aineiden saatavuuden tulisi olla hyvä ja hinnan edullinen.

Eräs kriteerit täyttävä molekyyliyhä on luonnossa esiintyvät steroidipohjaiset sappihapot.^{1,8,9,10} Niitä on tutkittu paljon, koska sappihapoilla on merkittävä biologinen rooli kolesterolin aineenvaihdunnassa ja niiden esiintyvyys luonnossa on suuri. Sappihappojen ominaisuuksiin kuuluu muotomuisti, jolloin ne voivat järjestäytyä palautuvasti erilaisiin rakenteisiin. Käytännössä sappihappopohjaiset polymeerit voivat esimerkiksi hajota kuumennuksen seurauksena, mutta palautua jäähtyttyään taas takaisin alkuperäiseen muotoonsa. Sappihapoilla on kahdesta neljään reaktiivista kohtaa, joihin voidaan muodostaa esimerkiksi esteri-, eetteri- tai amidisisidos. Lisäksi niiden monimuotoisuutta lisää amfipaattisuus. Näiden ominaisuuksien perusteella sappihapoista saadaan valmistettua isokokoisia komplekseja.

4. SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT JA BIOLÄÄKETIEDE

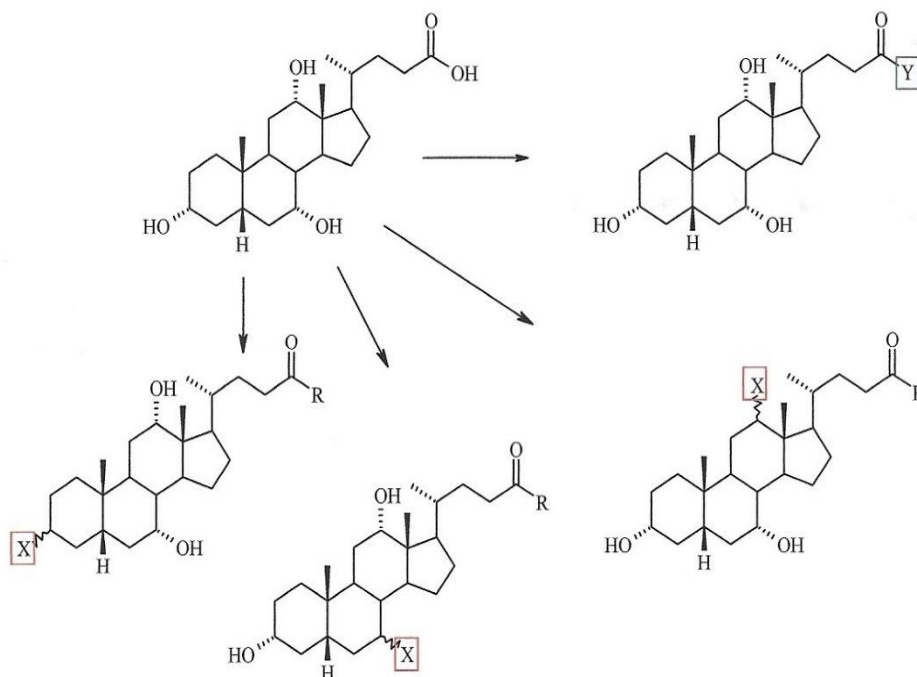
Biolääketiede on osa modernia lääketiedettä, jossa yhdistyvät biologia ja muut luonnontieteet, ja johon perinteinen lääketiede tuo mukanaan klinisen puolen.^{11,12} Biolääketieteen tavoitteena on luoda entistä parempia varaosia ihmisille. Biohajoavia materiaaleja on tutkittu ja kehitelty jo 40 vuotta. Biolääketieteellinen tekniikka on uusi tieteenhaara, jonka päätarkoituksena on suunnitella tekniikan säännöillä uusia lääkkeiden ja biohajoavien materiaalien yhdistelmiä, joiden avulla voidaan parantaa terveydenhuoltoa. Insinöörien suunnittelu- ja ongelmanratkaisutaidot sekä eri luonnontieteiden tuntemus ovat avainasemassa, kun yritetään luoda uusia biomateriaaleja. Biolääketieteen voisi sanoa olevan melko uusi ja monitieteinen kokonaisuus.

Perinteisiä lääkeaineita on yritetty jo pitkään parantaa tekemällä niistä synteettisiä johdoksia, joilla olisi parempia ominaisuuksia kuin alkuperäisellä lääkkeellä.^{7,10} Biolääketiede taas pyrkii löytämään molekyylejä, joilla on hyvät lääketieteelliset ominaisuudet, kuten myrkyttömyys, bioaktiivisuus ja biohajoavuus. Yleisiä esteitä jonkin lääketieteellisesti lupaavan molekyylin käytölle ovat taloudelliset tekijät, kuten kalliit valmistuskustannukset tai raaka-aineiden huono saatavuus. Esimerkkejä fysikaalisesta ja kemiallisesta esteestä ovat esimerkiksi pH- tai lämpötilaherkkyys. Lisäksi molekyylin tulisi olla palautuva. Biologinen este käytölle liittyy puolestaan siihen, että ihmisen oma immuunipuolustus hyökkää biomateriaalia vastaan. Toinen biologinen ongelma on se, että jos keho ei tunnista molekyyliä, se jää turhaan kuormittamaan aineenvaihduntaa. Lisäksi on mahdollista, että lääkeaine ei ole vesiliukoinen.

Näitä esteitä pyritään välttämään sitomalla lääkeaine biohajoavaan polymeeriin, jolloin lääkeaine ei menetä vaikutustehoa tai hajoa liian aikaisin.^{7,10} Eräs riskitekijä on myös lääkeainekuljettajan ajautuminen ennen lääkeaineen vapautumista suoraan munuasiin, sillä siitä voisi seurata myrkytys. Lisäksi erityisesti sappihappopohjaisilla polymeereillä huono selektiivisyys saattaa johtaa erilaisiin sivuvaikutuksiin. Näitä ongelmia on mahdollista kiertää erilaisilla strategioilla, kuten käyttämällä jotakin kuljettajaentsyymiä tai aktiivista kuljetusta, joka perustuu elimistön omien kuljettajaproteiinien toimintaan.

Sappihappopohjaisten polymeerien käyttö biolääketieteessä perustuu niiden enantioselektiivisyyteen, amfipaattisuuteen ja lähtöaineiden halpaan hintaan.⁷ Lisäksi useimmat sappihappopohjaiset polymeerit ovat suhteellisen myrkyttömiä ja ne kestävät elimistön lämpötilan ja pH-arvon. Sappihappopohjaisilla polymeereillä on myös kyky palautuvaan järjestymiseen. Konkreettisine esimerkkeinä voidaan mainita sappihappo-oligopeptidikonjugaattien käyttö farmakologisissa sovelluksissa, joissa pitkäketjuisia peptideistä muodostuvia rakenteita käytettiin osana rokotteiden kehittämistä.^{5,13} Lisäksi sappihappojen aminohappoestereitä on käytetty edistämään lääkeaine asikloviirin biosaatavuutta.^{7,14}

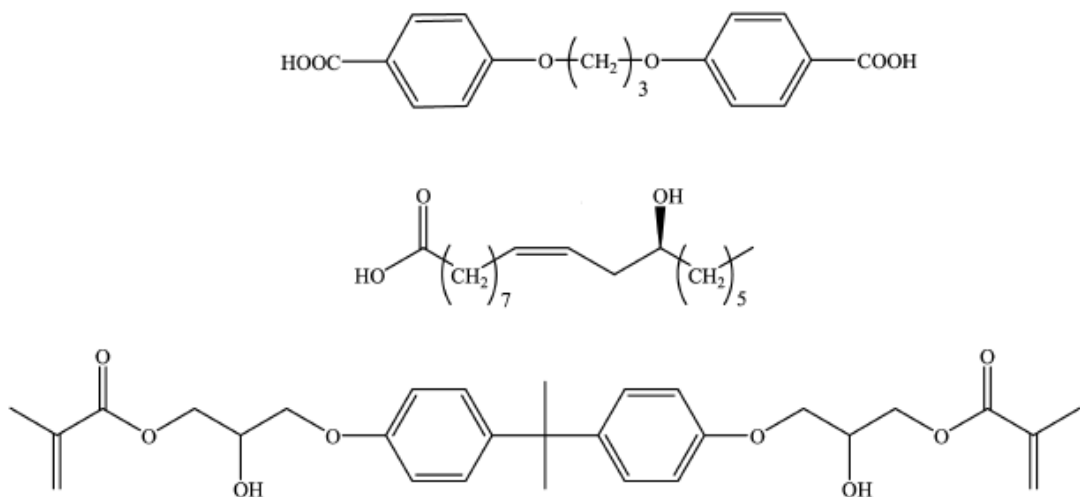
Kuvassa 4 on kuvattu kohtia, joihin lääkeaine voi sitoutua sappihapon rungossa.⁷ Lääkeaine voi liittyä hiileen C₃, C₇, C₁₂ tai C₂₄. Sappihappopohjaisissa polymeereissä, joita käytetään lääkeaineiden kuljetukseen ja annosteluun, molekyyli- ja ioniryhmä on usein korvattu anhydridillä (kuva 4).



Kuva 4: Potentiaalisia sappihappojohdannaisia ja kohtia, joihin lääkeaine voi sitoutua.⁷

4.1 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT LÄÄKEAINEIDEN ANNOSTELIJOINA JA KULJETTAJINA

Sappihappojen rooli kehossa on hajottaa liukenemattomia sappihappoyhdisteitä, kuten lektiiniä ja kolesterolia.¹⁰ Lisäksi sappihapot hajottavat lektiinin apuna triglyseridejä, joista edelleen pilkkoutumisen kautta muodostuu misellejä. Sappihapot osallistuvat lisäksi rasvahappojen hydrolyysiin. Sappihappojen suuren biologisen roolin perusteella niistä tehdyille polymeereille voisi olla monia biolääketieteellisiä sovelluksia, kuten lääkeaineiden kuljetus ja vapautus hydrofobisissa, joskus hydrofiilisissä, oloissa. Synteettiset biohajoavat polymeerit (kuva 5) ovat osoittaneet kykyä kontrolloituun lääkeaineen vapautukseen, jonka ansiosta lääkeaineella olisi parempi vaikutusteho. Tutkimuksissa on havaittu, että mitä enemmän kuljettajapolymeeriä lääkeaineen ympärillä oli, sitä hitaammin lääkeaine hajosi.¹⁰

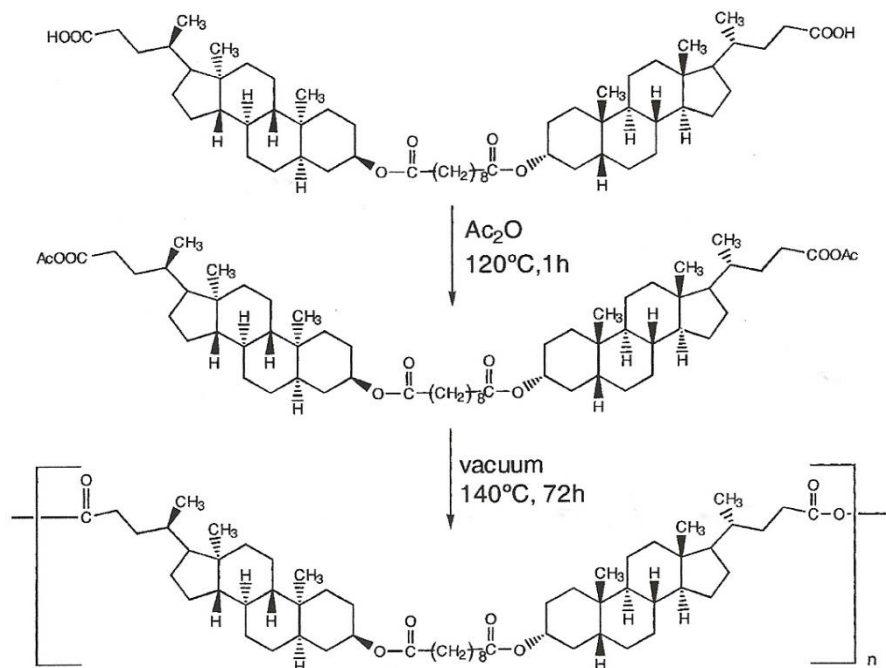


Kuva 5: Muutamia valikoituja biohajoavia molekyyliä.¹⁰

Elimistö käyttää sappihappoja kolesterolikataboliassa.^{8,9,10} Sappihappojen biologinen ja fysiologinen rooli on tiedetty jo kauan, mutta niiden biokemiaa on tutkittu vasta vähän. Sappihappopohjaisten polymeerien kemia sallii erilaisten rakenteiden suunnittelun ja muokkaamisen. Itsestään biohajoavat polymeerit vaikuttavat lupaavilta kandidaateilta erilaisiin sovelluksiin. Kaiken lisäksi niiden etuina ovat hyvä saatavuus ja halpa hinta.

4.1.1 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYANHYDRIDIT

1930-luvulla syntetisoitiin sappihappopohjaisia polyanhydridejä, joita pyrittiin tarjoamaan tekstiiliteollisuuden käyttöön vaatamateriaaliksi.^{9,15} Syntetisoitujen polymeerien hydrolyyttinen epävakaus kuitenkin esti niiden hyödyntämisen tekstiiliteollisuudessa. Myöhemmissä polyanhydriditutkimuksissa todettiin, että litokoolihappo on eräs potentiaalinen ehdokas perusrakenneyksiköksi, kun näkökulmana on sappihappojen käyttö biolääketieteessä. Kokeessa litokoolihaposta tehtiin kopiopolymeroinnin avulla dimeeri, josta muokattiin edelleen polykondensaatioreaktiolla polyanhydridejä (kuva 6).¹⁵ Toisessa tutkimuksessa käytettiin suoraan litokoolihappoa, joka reagoi sebastiinihappojohdannaisen kanssa.¹⁵ Syntetisoitujen litokoolihappopohjaisten polymeerien rakennetta tutkittiin FT-IR-spektroskopialla ja polymeerien kokoa tarkasteltiin SE-kromatografialla. Tuloksista ilmeni, että polykondensaatiolla saadaan puhtaita tai helposti puhdistettavissa olevia tuotteita. Polymeerin kiteytyminen vei noin viikon ajan, jolloin saantoprosentti oli 50. Pidempi aika ei juuri muuttanut saantoa merkittävästi.

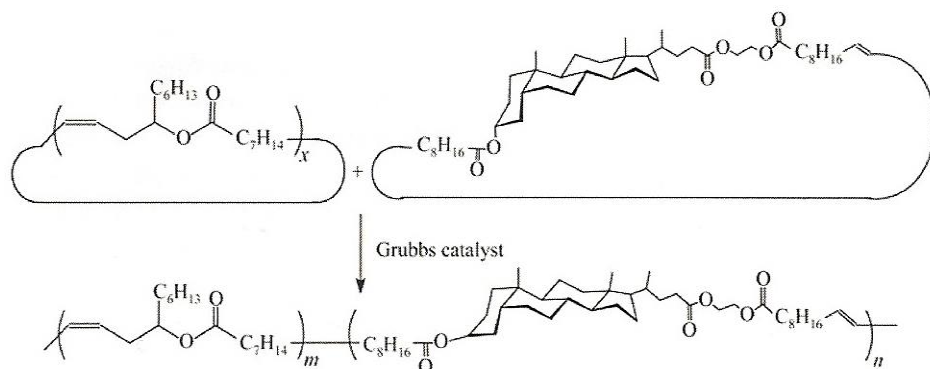


Kuva 6: Litokoolihaposta syntetisoituja polyanhydrididimeerejä.¹⁵

Syntetisoituja polymeerejä on testattu sekä ihmisen että sian soluilla, ja saadut tulokset vahvistivat sappihappopohjaisten polyanhydridipolymeerien olevan myrkyttömiä.^{9,15} Sappihappopohjaisia polyanhydridejä voitaisiin käyttää hoitamaan lääkaineiden kontrolloitua vapautusta. Koska polyanhydridit pystyvät vuorovaikuttamaan kehon omien biomolekyylien kanssa, lääkeaine voitaisiin vapauttaa heti kohdesolun reseptoreilla. Myös mahdollisuutta lääkeaineen hitaaseen, kuukausia kestävään, kontrolloituun vapautukseen ollaan tutkimassa. Yleisesti näiden polymeerien hyvänä puolena voidaan pitää sitä, että käytön jälkeen ne saadaan hajoamaan ja poistumaan elimistöstä, jolloin ne eivät jää turhaan kuormittamaan elimistöä ja sen aineenvaihduntaa.

4.1.2 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYESTERIT

Entropian ajama renkaanavauspolymerointi (ED-ROP) perustuu siihen, että reaktio on täysin entropian ajama.⁸ Tällöin reaktiossa ei vapaudu lämpöä eikä se vahingoita molekyyliä. Reaktio tapahtuu minuuttien kuluessa molekyylipainon perusteella suurille yhdisteille. Menetelmää on käytetty muun muassa demonstroimaan entsyymien polymerisaatiota. Professori Julian Zhu (X. X. Zhu) tutkimusryhmineen⁸ on tutkinut ED-ROP-polymerointia syntetisoimalla sappihappopolymereitä käyttäen lähtöaineena litokoolihaposta valmistettuja 3 α - ja 3 β -dimeerejä sekä toisen sukupolven Grubb`sin katalyyttiä (kuva 7). Toisen ryhmän tutkimuksissa luotiin koolihappopohjaisia dendrimeerejä, joissa oli sappihappopohjainen ydin ja hydrofiilinen kuori. Näiden rakenne määriteltiin ja ratkaistiin NMR-spektroskopian avulla.⁸

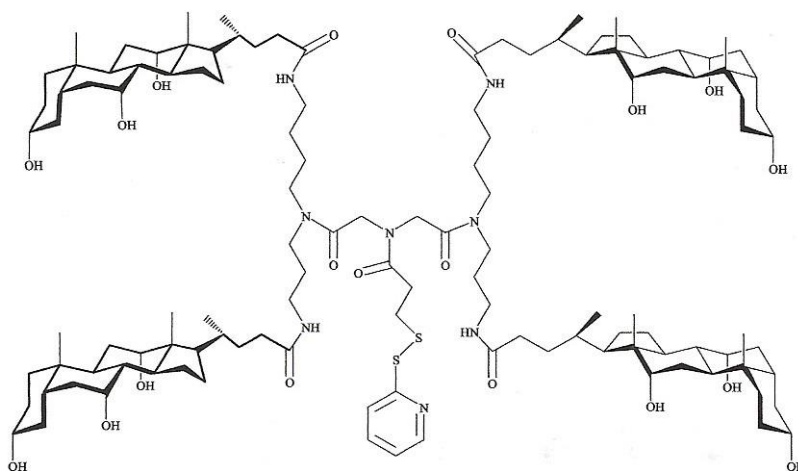


Kuva 7: Entropian ajama renkaanavauspolymerointi.⁸

Tuloksena havaittiin sappihappopohjaisten polyestereiden olevan hyviä rakennuspalikoita isokokoisten molekyylien suunnittelun kannalta.^{9,10} Litokoolihappopohjaisten polyestereiden hyvinä puolina ovat niiden kumimainen elastisuus ja muotomuisti sekä biohajoavuus. Koolihappopohjaiset polyesterit olivat hyvin samankaltaisia lukuun ottamatta sitä, että niiden rakenne oli hieman jäykempi. Edellä mainittujen ominaisuuksin vuoksi sappihappopohjaisten polyestereiden käyttömahdollisuuksia eri biomateriaaleissa pidettiin lupaavina. Tutkimusten mukaan erityisesti koolihappopohjaiset polyesterit sopivat lääkeaineiden kuljetukseen.

4.1.3 SAPPIHAPPOPOHJAISET AMIDIT

Sappihappopohjaisista amideista esimerkkinä voidaan mainita koolihappopohjaiset dendrimeerit, jotka muodostuvat amidisidoksin.⁹ Näitä polymeerejä ovat tutkineet muun muassa Regen tutkimusryhmineen. Sappihappopohjaisten amidien etuna on se, että amidisidos on vahvempi kuin esterisidos ja niiden selektiivisyys on parempi. Myös deoksikoolihaposta, spermidiinistä ja lysiinistä koostuvia molekyyliarakenteita on tutkittu. Näitä rakenteita nimitetään yhteisesti molekyyliestevarjoiksi (kuva 8), sillä niiden oletettuna tehtävänä on hoitaa hydrofiilisten lääkeaineiden kuljetusta hydrofobisten kalvojen läpi.

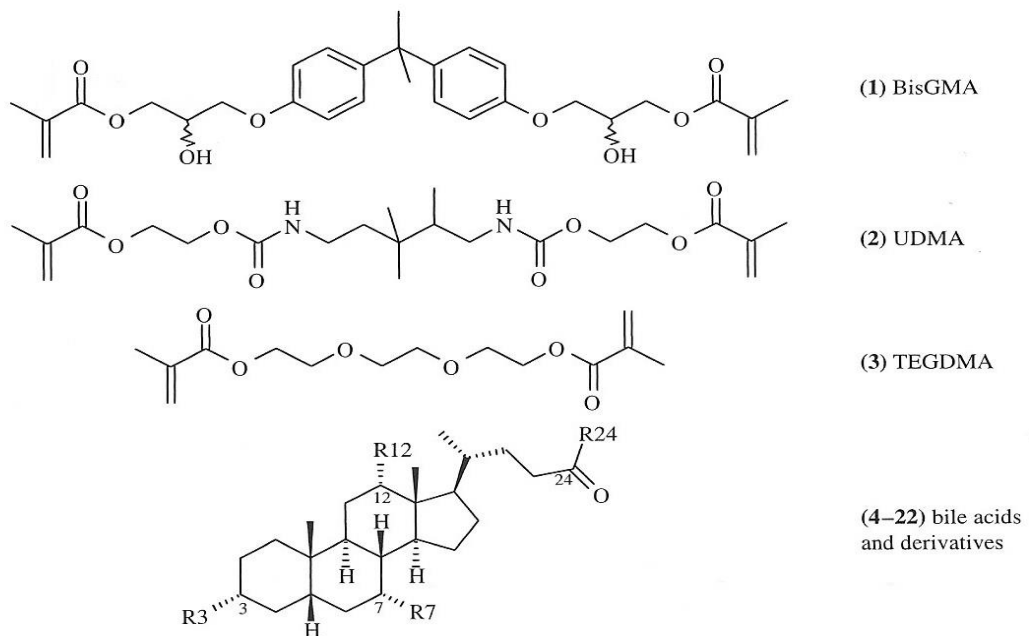


Kuva 8: Esimerkki sappihappopohjaisesta molekyyliestevarjosta.¹⁰

4.2 SAPPIHAPPOPOHJAISET POLYMEERIT TÄYTEAINEENA HAMMASLÄÄKETIETEESSÄ

Sappihappopohjaisten polymeerien käyttöä on tutkittu hammaslääketieteessä syntetisoimalla metakryylijohtannaisia.¹⁶ Tulosten perusteella silloittuneita sappihappojen metakryylijohtannaisia on ehdotettu hampaiden paikka-aineiksi niiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien, kuten myrkyttömyyden, reagoimattomuuden ja hajoamattomuuden perusteella. Vastaavissa kaupallisissa paikka-aineissa käytetyt metakryylimonomeeri johdannaiset ovat myrkyllisiä reagoimattomina monomeereinä, mutta kiinteinä muovimateriaaleina ne ovat potilaalle haitattomia.

Marc A. Gauthier *et. al.* ovat tutkineet¹⁶ koolihapon, kenodeoksikoolihapon, deoksikoolihapon ja litokoolihapon sekä niiden yksinkertaisten estereiden ja metakrylaattijohdannaisten sytotoksisuutta. Näille molekyyileille on arveltu olevan käyttöä hammaslääketieteellisissä sovelluksissa. Vertailukohtana on käytetty tyypillisiä hammaslääketieteessä käytettyjä metakryylijohtannaisiin pohjautuvia muovimateriaaleja, kuten BisGMA, UDMA ja TEGDMA (kuva 9). Koe suoritettiin *in vitro* eli elävän solun ulkopuolella. Kolorimetriaa käytettiin analysoimaan sappihappojen ja niiden johdannaisten reagointia fibroblastien kanssa.



Kuva 9: Hampaiden paikka-aineissa käytettävien sappihappopohjaisten molekyylien rakenteita.¹⁶

Tutkijoiden oletuksena oli, että sappihappopohjaisilla polymeereillä saattaisi olla hammaslääketieteellistä käyttöä.¹⁶ Tätä väitettä tukivat tieto sappihappopohjaisten polymeerien muokattavuudesta ja niiden suhteellisen vähäinen sytotoksisuus sekä niistä saatavien materiaalien lujuus. Kokeissa saaduista tuloksista ei ilmennyt mitään yllättävää, vaan ne tukivat aiempia havaintoja ja oletuksia. Niiden perusteella vahvistui, että sappihappojen di-, tri- ja tetra-metakrylaattijohdannaiset ovat vähemmän sytotoksisia kuin vastaavat kaupalliset valmisteet BisGMA ja UDMA. Sappihappojen mono-metakrylaatit ja esterit olivat yhtä sytotoksisia kuin BisGMA ja UDMA. Luonnolliset sappihapot olivat kaikkein vähiten sytotoksia. Näitä tuloksia voidaan käyttää tutkimuksissa, joissa pyritään kehittämään sappihappopohjaisille polymeereille käyttökohteita biolääketieteessä.

5. YHTEENVETO

Sappihapot ovat laajaan steroidiperheeseen kuuluvia yhdisteitä, joita esiintyy elimistössä yleensä vesiliukoisina tauriini- ja glysiinikonjugaatteina. Niiden tutkimus alkoi 1900-luvun alussa, mutta systemaattinen tutkimus alkoi vasta 1950-luvulla. Elimistössä sappihappojen rooli on osallistua enterohepaattiseen kiertoon, jossa ne kiertävät reittiä suolisto–porttilaskimo–maksa–sappi–suolisto ja poistavat samalla elimistöstä kolesterolia virtsan ja ulosteen mukana.

Biolääketiede on pyrkinyt löytämään uusia molekyyliä, joita on helppo muokata ja joilla on hyvät lääketieteelliset ominaisuudet. Lupaavaksi yhdisteryhmäksi ovat paljastuneet sappihapot. Niillä on muotomuisti ja kahdesta neljään reaktiivista kohtaa, mikä tekee sappihapoista helposti muokattavia ja monimuotoisia. Tällöin ne sopivat erinomaisesti synteettisen kemian ja biolääketieteen rakennuspalikoiksi. Sappihappopohjaisten polyanhydridien, estereiden ja amidien käyttöä lääkeaineen kuljettajina sekä annostelijoina on tutkittu useissa eri tutkimusryhmissä. Tulokset vaikuttavat lupaavilta, mutta lisätutkimuksia tarvitaan vielä. Lisäksi sappihappopohjaisten polymeerien käyttöä hammaslääketieteessä on tutkittu syntetisoimalla metakryylijohtannaisia. Saatujen tulosten perusteella niitä on esitetty uusiksi hampaiden paikkamateriaaleiksi.

Viimeaikaisten tutkimusten perusteella sappihapoista on mahdollista valmistaa sappihappopohjaisia polymeerejä, jotka soveltuvat biolääketieteen tarpeisiin. Nämä uudet sovellukset tarjoavat tulevaisuudessa parempia ja yksilöllisempiä lääketieteellisiä ratkaisuja.

KOKEELLINEN OSA

Sappihappojen alkyyliamidijohdannaisten valmistaminen

6. TYÖN TARKOITUS

Kandidaatintutkielman kokeellisen osan tarkoituksena oli valmistaa sappihappojen alkyyliamidijohdannaisia. Taustalla oli kiinnostus selvittää valmistettujen molekyylien gelatointiominaisuuksia ja verrata niitä aiemmissä tutkimuksissa testattuihin sappihappojohdannaisten gelatoitumisominaisuuksiin.

Ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin litokoolihaposta metyyllitokolaattia, josta edelleen yritettiin valmistaa litokoolihapon spermidiiniamidia. Tämän epäonnistuttua kokeiltiin seuraavaksi valmistaa metyyllitokolaatista litokoolihapon etyyliamidia. Viimeisenä kokeiltiin valmistaa litokoolihapon anhydridistä litokoolihapon etyyliamidia. Viimeinen synteesi onnistui ja valmistettua molekyyliä on tarkoitus hyödyntää myöhemmin sappihappojohdannaisten gelatointiominaisuuksien tutkimuksissa.

7. MENETELMÄT, LAITTEET JA KÄYTETYT REAGENSIT

Synteesituotteiden puhdistuksessa käytettiin pylväs- ja ohutlevykromatografiaa. Ohutlevyinä käytettiin Merckin Kieselgel 60 F₂₅₄ -ohutlevyjä, joiden koko oli 20 x 20 cm. Pylväspuhdistuksessa käytettiin Merckin Kieselgel 60 -geeliä, jonka partikkelikoko oli 0,040–0,063 mm. Eluenttina käytettiin kloroformin ja metanolin 96:4 seosta. Synteesituotteista ajettiin ¹H NMR –spektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker Avance 300 MHz ja Bruker Avance 400 MHz NMR-spektrometreillä. Liuottimena NMR-näytteissä oli deuterokloroformi, jonka jäännösprotonisignaalia, $\delta(\text{CD}_2\text{HCl}) = 7,26$ ppm, käytettiin referenssinä. Reaktiokaavioiden ja molekyylien kuvat piirrettiin ChemBioDraw-ohjelmalla.

Taulukossa 1 on esitetty synteeseissä käytetyt reagenssit ja niiden puhtaus sekä valmistaja.

Taulukko 1: Synteeseissä käytetyt reagenssit.

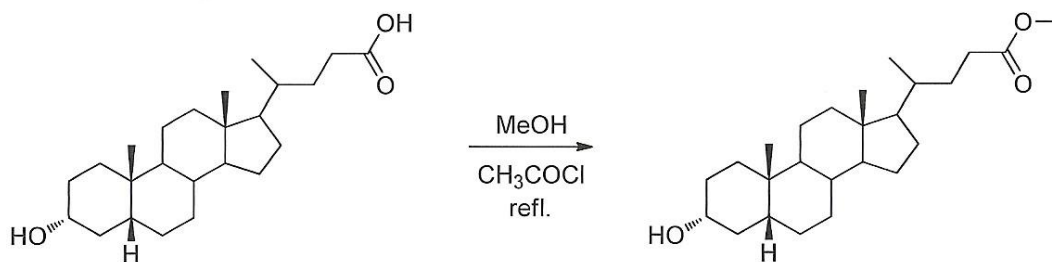
Reagenssi	Puhtaus	Valmistaja
Litokoolihappo	97 %	Sigma
Metanoli	99,8 %	Sigma-Aldrich
Asetyylikloridi	–	–
Spermiini	99 %	Sigma
Etyyliamiinihydrokloridi	–	Fluga AG, Bucks SG
Trietyyliamiini	99 %	Sigma-Aldrich
DMF	100 %	BOH Prolabo
Na ₂ SO ₄	99,9 %	Prolabo
Dikloorimetaani	–	Fischer
Kloroformi	99 %	VWR
Vetykloridihappo	–	–
Brine (kylläinen NaCl-liuos)	–	–
Etyyliklooriformiaatti	97 %	Merck
1,4–dioksaani	99 %	VWR
Rikkihappo	–	–

Etyyliklooriformiaatti tislattiin ennen käyttöä ja 1,4–dioksaani oli kuivattu Na-langalla.

8. SYNTEESIT

Tässä kappaleessa esitellään kandidaatintutkielman kokeellisen osan aikana tehdyt synteesit pääpiirteittäin. Kappaleessa 11 on esitetty tarkat synteesiohjeet.

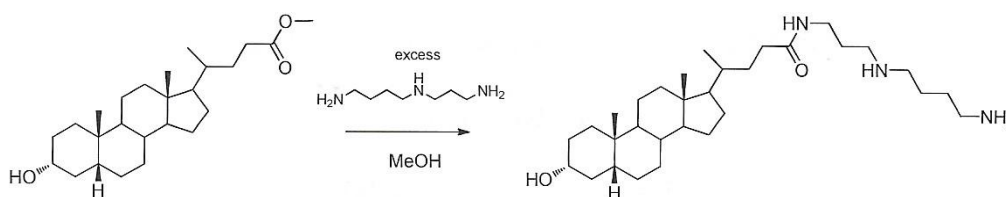
8.1 METYYLILITOKOLAATTI



Kuva 10: Metyylilitokolaatin valmistus¹⁷

Litokoolihappoa punnittiin kolviin ja liuotettiin metanoliin. Tämän jälkeen kolviin lisättiin magneettisauva ja pipetoitiin katalyyttinen määrä eli 3 pisaraa asetyylikloridia. Refluksoitiin yön yli öljyhauteella +100 °C:ssa, minkä jälkeen reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilassa. Liuotin evaporoitiin pois ja tuotteesta mitattiin ¹H NMR-spektri.

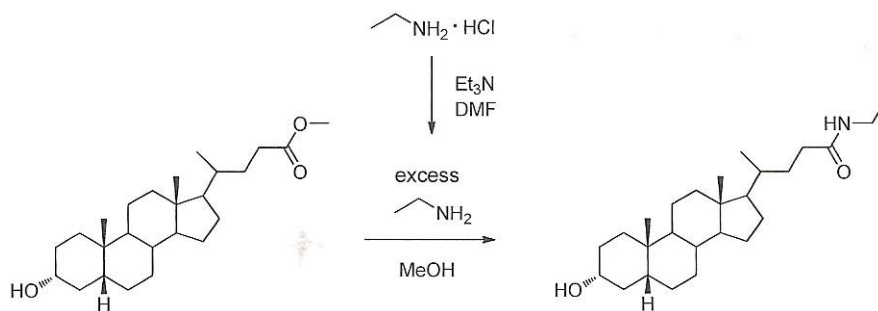
8.2 LITOKOOLIHAPON SPERMIDIINIAMIDI



Kuva 11: Litokoolihapon spermidiiniamidin valmistus^{18,19,20}

Edellisessä synteesissä valmistettua metyyllitokolaattia punnittiin kolviin ja liuotettiin metanoliin. Seokseen lisättiin ylimäärä spermidiiniä. Tämän jälkeen lisättiin magneettisauva, ja reaktioseosta refluksoidiin öljyhauteella yön yli +100 °C:ssa. Seos kaadettiin 250 ml:aan jäävettä. Kiinteä aine suodatettiin ja pestiin jääkylmällä vedellä käyttäen apuna imupulloa ja sintteriä. Tuotteesta mitattiin ¹H NMR-spektri.

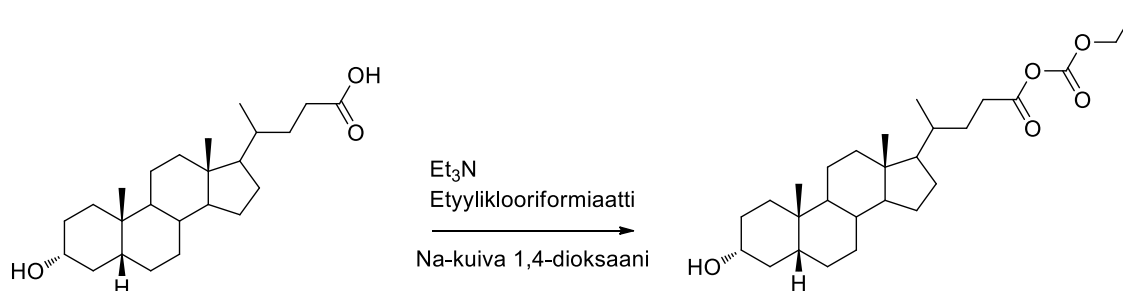
8.3 LITOKOOLIHAPON ETYYLIAMIDIN VALMISTAMINEN



Kuva 12: Litokoolihapon etyyliamidin valmistus^{18,19,20}, tapa 1

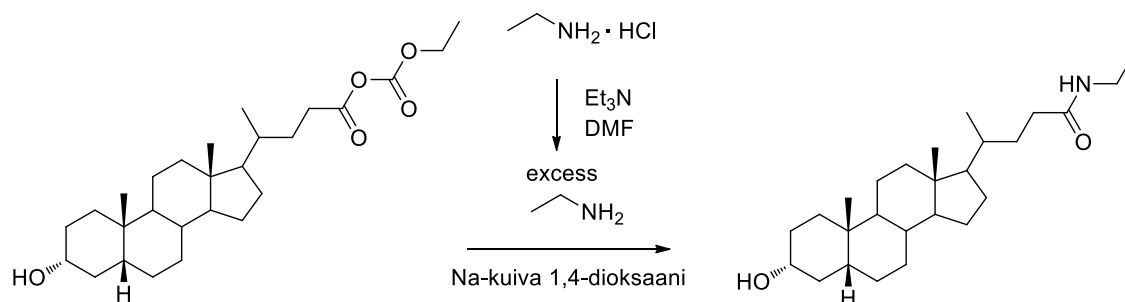
Kolmikaulakolvissa jäähdytettiin DMF:a 0 °C:een suola–jää–vesihauteen avulla (yhdessä kaulassa säädettävä lämpömittari, toisessa CaCl₂–putkella varustettu pystyjäähdyttävä, ja kolmas kaula vapaana amiinin hydrokloridin lisäystä varten). Kolviin asetettiin magneettisauva ja lisättiin ylimäärä etyyliamidin hydrokloridia. Tämän jälkeen kolviin lisättiin tiputussuppilon kautta hitaasti ylimäärä trietyyliamidia. Suola–jää–vesihaude poistettiin ja seoksen annettiin sekoittua magneettisekoittajalla 30 minuuttia huoneenlämpötilassa.

Kaksikaulakolviin punnittiin metyyllitolokolaattia, joka liuotettiin metanoliin. Edellisessä vaiheessa valmistettu DMF:iin liuotettu etyyliamiini lisättiin tipoitain kolviin ja seosta refluksoititiin yön yli öljyhauteella +100 °C:ssa. Tämän jälkeen seos kaadettiin 200 ml:aan jäävettä ja kiinteä aine suodatettiin Büchner-suppiloa ja sintteriä käyttäen. Raakatuotteesta mitattiin ¹H NMR-spektri.



Kuva 13: Litokoolihapon anhydridin valmistus^{21,22,23,24}

Koska edellä kuvattu synteesi ei onnistunut, päätettiin kokeilla toista valmistustapaa. Tarkoituksena oli tehdä litokoolihaposta reaktiivisempi, jolloin päätettiin valmistaa litokoolihapon anhydridi. Litokoolihappoa liuotettiin Na-kuivattuun dioksaaniin 100 ml:n kolmekaulakolvissa. Kolviin lisättiin magneettisauva ja seos jäähdytettiin +10 °C:een. Kolviin lisättiin ylimäärä trietyyliamidia tiputussuppilon kautta. Tämän jälkeen kolviin lisättiin hitaasti vastatislattua etyyliklooriformiaattia, joka oli liuotettu 3 ml:aan Na-kuivattua dioksaania. Jää-vesihaude poistettiin ja seoksen annettiin sekoittua magneettisekoittajalla huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.



Kuva 14: Litokoolihapon etyyliamidin valmistus^{21,22,23,24}, tapa 2

Etyyliamiini vapautettiin hydrokloridisuolastaan kuten edellä. Tämän jälkeen DMF:iin liuotettu etyyliamiini lisättiin tipoitain kolviin, jossa oli litokoolihapon anhydridiä. Seosta refluksoititiin yön yli öljyhauteella +100 °C:ssa, jonka jälkeen seoksen annettiin jäähtyä ja liuotin evaporoitiin pois käyttäen rotavapororia.

Raakatuote liuotettiin 100 ml:aan CHCl_3 :a. Orgaanista kerrosta pestiin vedellä, HCl-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja suodatettiin sekä liuotin evaporoitiin pois rotavaporilla. Tuotteista mitattiin ^1H NMR-spektrit.

Litokoolihapon anhydridistä valmistetulle raakatuotteelle suoritettiin pylväskromatografinen puhdistus. Pylvästä kerättiin koeputkiin useita fraktioita. Tämän jälkeen joka toiselle koeputkelle suoritettiin ohutlevykromatografinen ajo. Ajojen perusteella pääteltiin mitkä fraktiot yhdistetään. Yhdistetyistä fraktiosta mitattiin ^1H

NMR-spektrit, joiden perusteella löydettiin puhdas tuote. Puhdistettu tuote kuivattiin vakuuminlinjassa ja siitä mitattiin ^1H NMR-spektri.

9. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Metyylilitokolaattia valmistettiin kaksi kertaa (JA-001 ja JA-005). Yhdisteen teoreettinen saanto synteesiohjeen perusteella oli 3,16 g. Todellinen saanto tuotteelle JA-001 oli 2,85 g ja tuotteelle JA-005 2,96 g. Tuotteiden puhtaus varmistettiin ^1H NMR-spektroskopiaa käyttäen. Liitteinä 1 ja 2 olevissa spektreissä havaitaan siirtymä 3,5–4,0 ppm:n välissä. Siirtymän integraali on lähellä kolmea, mikä vastaa esteröityneen metyyliryhmän signaalia. Saantoprosentti tuotteelle JA-001 oli 90,2 % ja tuotteella JA-005 93,7 %.

Litokoolihapon spermidiiniamidia (JA-002 ja JA-003) yritettiin valmistaa kaksi kertaa. Ensimmäisellä kerralla käytettiin noin 10-kertainen ylimäärä spermidiiniä. Toisella kerralla spermidiiniä käytettiin noin 1,1-kertainen ylimäärä. Reaktion etenemistä ja tuotteen puhtautta tutkittiin ^1H NMR-spektroskopiaa käyttäen. Liitteinä 3 ja 4 olevissa spektreissä havaitaan signaalit kemiallisen siirtymän arvoilla 6.2 ppm ja 6.8 ppm, jotka esiintyvät tyypillisesti amidiprotonien alueella. Synteeseissä JA-002 ja JA-003 syntyi spermidiiniamidien seos, jossa spermidiini oli reagoinut erikseen molemmista aminoryhmistään. Lisäksi saannot olivat molemmilla kerroilla niin pienet, että tuotteita ei alettu puhdistaa. Yhdisteen JA-002 teoreettinen saanto oli 0,19 g ja yhdisteen JA-003 1,30 g.

Litokoolihapon etyyliamidia yritettiin valmistaa kolme kertaa (JA-004, JA-006 ja JA-007). Ensimmäisellä kerralla reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä ja toisen yön yli refluksoitettiin. Reaktion etenemistä seurattiin ^1H NMR-spektroskopian avulla. Spektreissä havaittiin signaali kemiallisen siirtymän arvolla 4,5 ppm. Signaalin integraali oli noin 1 (liite 5). Tämän arveltiin vastaavan amidiprotonia ja reaktion arveltiin onnistuneen. Pesujen jälkeen orgaaniseen faasiin jäi kuitenkin vain metyylilitokolaattia (liite 6). Toisella kerralla reaktioseosta refluksointi yhden yön yli. Pesujen jälkeen

orgaaniseen faasiin jäi jälleen vain metyyllitokolaattia (liite 7), joten synteesit epäonnistuivat. Teoreettinen saanto tuotteille JA-004 ja JA-006 oli 1,55 g.

Kolmannella kerralla litokoolihapon etyyliamidia valmistettiin antamalla etyyliamidin reagoida reaktiivisemmän litokoolihapon anhydridin kanssa. Pesujen jälkeen raakatuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri, jonka perusteella raakatuotteen joukossa oli haluttua tuotetta. Seokselle päätettiin tehdä pylväskromatografinen puhdistus. Pylvästä kerättiin koeputkiin 76 fraktiota. Ohutlevykromatografian perusteella päätettiin, mitkä fraktiot yhdistetään. Fraktiot 25–35, 36–50 ja 51–76 päätettiin yhdistää. Fraktioista mitattujen ^1H NMR-spektrien vertailun perusteella todettiin, että fraktiot 51–76 eivät sisältäneet tuotetta. Lisäksi fraktioiden 36–50 ^1H NMR-spektrissä näkyi hiilen 18 kohdalla epäpuhtauksia. Fraktioissa 25–35 todettiin olevan puhdasta tuotetta. Liitteenä 8 on puhtaan tuotteen ^1H NMR-spektri. Teoreettinen saanto tuotteelle JA-007 oli 2,70 g ja todellinen saanto 0,098 g. Saantoprosentti tuotteelle JA-007 oli 3,63 %.

10. YHTEENVETO

Suurin osa synteseistä epäonnistui. Metyyllitokolaatista yritettiin valmistaa litokoolihapon spermidiiniamidia. Raakatuote oli kuitenkin spermidiiniamidien seos, jota ei vähäisen määrän vuoksi ollut järkevää puhdistaa. Myöskään metyyllitokolaatista valmistettua litokoolihapon etyyliamidia ei saatu puhdistettua. Reaktiota ei mahdollisesti edes tapahtunut. Litokoolihapon anhydridistä onnistuttiin kuitenkin valmistamaan puhdasta litokoolihapon etyyliamidia. Valmistettua tuotetta voidaan käyttää tulevilla gelatointikokeissa.

11. SYNTEESIOHJEET

11.1 METYYLILITOKOLAATTI

Yhdistettä valmistettiin kaksi kertaa (JA–001 ja JA–005). Litokoolihappoa liuotettiin 3,01 g (8 mmol) 50 ml:aan metanolia 100 ml:n kolvissa. Katalyytiksi lisättiin 3 Pasteur-pipetin tippaa asetyylikloridia. Reaktioseosta refluksoitiin yön yli noin +100 °C:ssa. Refluksoinnin jälkeen liuotin evaporoitiin pois käyttämällä rotavaporia. Tuotteen puhtaus varmistettiin NMR-spektroskopiaa käyttäen, jonka jälkeen tuote vietiin kuivumaan yön yli vakuuminlinjaan.

11.2 LITOKOOLIHAPON SPERMIDIINIAMIDI

Yhdistettä yritettiin tehdä kaksi kertaa (JA–002 ja JA–003). Ensimmäisellä kerralla käytettiin noin 10–kertainen ylimäärä spermidiiniä ja reaktioseosta refluksoitiin öljyhauteella 48 h. Toisella kerralla spermidiiniä oli noin 1,1–kertainen ylimäärä ja reaktioseosta refluksoitiin 24 h.

Synteesiohje tuotteelle JA–002:

Edellisessä vaiheessa valmistettua metyyllitokolaattia liuotettiin 0,15 g (0,38 mmol) 25 ml:aan metanolia 50 ml:n kolvissa. Seokseen lisättiin 0,57 g (3,5 mmol) spermidiiniä. Reaktioseosta refluksoitiin öljyhauteella 48 h +100 °C:ssa. Reaktion etenemistä seurattiin ¹H NMR–spektroskopian avulla. Kun reaktio oli saavuttanut tasapainotilan, seos kaadettiin 400 ml:aan jäävettä. Kiinteä aine suodatettiin imupulloa ja sintteriä apuna käyttäen sekä pestiin 4 kertaa pienellä määrällä vettä. Saatu kiinteä aine karakterisoitiin NMR-spektroskopiaa käyttäen. Tuotetta ei alettu puhdistamaan pienen määrän vuoksi.

Synteesiohje tuotteelle JA–003:

Edellisessä vaiheessa valmistettua metyyllitokolaattia liuotettiin 1,02 g (2,6 mmol) 25 ml:aan metanolia 50 ml:n kolvissa. Seokseen lisättiin 0,41 g (2,8 mmol) spermidiiniä. Reaktioseosta refluksoitiin yön yli öljyhauteella noin +100 °C:ssa. Refluksoinnin jälkeen

varmistettiin NMR-spektroskopiaa käyttäen, että reaktio on saavuttanut tasapainotilansa. Tämän jälkeen seos kaadettiin 100 ml:aan jäävettä. Kiinteä aine erotettiin suodattamalla imupulloa ja sintteriä apuna käyttäen sekä pestiin kerran pienellä määrällä jäävettä. Saatu kiinteä aine karakterisoitiin NMR-spektroskopiaa käyttäen. Tuotetta ei alettu puhdistamaan pienen määrän vuoksi.

11.3 LITOKOOLIHAPON ETYYLIAMIDI

Yhdistettä valmistettiin kolme kertaa (JA-004, JA-006 ja JA-007). Ensimmäisellä kerralla reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa ja toisen yön yli seosta refluksoitettiin +100 °C:ssa öljyhauteella. Toisella kerralla seosta refluksoitettiin yön yli +100 °C:ssa öljyhauteella ja kolmannella kerralla sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Ensimmäisessä ja toisessa synteesissä käytettiin lähtöaineena metyyllilitokolaattia, mutta kolmannella kerralla käytettiin reaktiivisempaa litokoolihapon anhydridiä.

Synteesiohje JA-004:

Suola-jää-vesihauteen avulla jäähdytettiin 30 ml DMF:a 0 °C:een 250 ml:n kolmekaulakolvissa (yhdessä kaulassa säädettävä lämpömittari DMF:n lämpötilan tarkkailemiseksi, toisessa CaCl₂-putkella varustettu pystyjäähdyttävä ja kolmas kaula vapaana amiinin hydrokloridin lisäystä varten). Kolviin asetettiin magneettisauva ja kolviin lisättiin koko ajan sekoittaen 6,20 g etyyliamidin hydrokloridia. Tämän jälkeen kolviin lisättiin tiputussuppilon kautta hitaasti 11 ml trietyyliamidia. Suola-jää-vesihaude poistettiin ja seoksen annettiin sekoittua magneettisekoittajalla huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan.

250 ml:n kaksikaulakolviin punnittiin 1,35 g metyyllilitokolaattia ja se liuotettiin 50 ml:aan metanolia. Edellisessä vaiheessa valmistettu DMF:iin liuotettu etyyliamiini lisättiin tipoitain kolviin ja sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin ¹H NMR-spektroskopian avulla. Tämän jälkeen seosta refluksoitettiin yön yli öljyhauteella +100 °C:ssa. Refluksoinnin jälkeen varmistettiin NMR-spektroskopiaa käyttäen, että reaktio on saavuttanut tasapainotilansa. Seos kaadettiin 200

ml:aan jäävettä. Kiinteä aine suodatettiin imupulloa ja sintteriä käyttäen sekä pestiin kaksi kertaa pienellä määrällä jääkylmää vettä. Raakatuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri.

Raakatuote liuotettiin 100 ml:aan CHCl_3 :a. Orgaaninen kerros pestiin 2x75 ml:lla vettä, 2x75ml:lla 0,1 M HCl-liuosta, 2x75 ml:lla vettä ja 2x75 ml:lla kylläistä NaCl-liuosta. Orgaaninen kerros kuivattiin Na_2SO_4 :lla, kuivausaine suodatettiin ja liuotin evaporoitiin pois rotavaporilla. Saatu kiinteä aine karakterisoitiin NMR-spektroskopiaa käyttäen. Tuote JA-004 osoittautui metyyllitokolaatiksi, joten sitä ei kuivattu vakuuminjassa.

Synteesiohje JA-006:

Synteesi suoritettiin pääosin synteesiohjeen JA-004 mukaisesti. Poikkeuksena oli, että reaktioseosta ei sekoitettu aluksi yön yli huoneenlämpötilassa, vaan seoksen refluksointi aloitettiin heti.

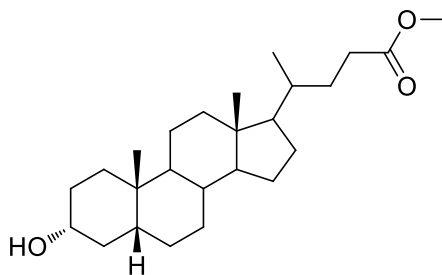
Synteesiohje JA-007:

Litokoolihappo 1,89 g (5 mmol) liuotettiin 42 ml:aan Na-kuivattua dioksaania 100 ml:n kolmikaulakolvissa. (Yhdessä kaulassa säädettävä lämpömittari, toisessa CaCl_2 -putkella varustettu pystyjäähdyttävä ja kolmannessa kaulassa tiputussuppilo). Kolviin lisättiin magneettisauva ja seos jäähdytettiin jää-vesihauteessa $+10\text{ }^\circ\text{C}$:een. Kolviin lisättiin 0,94 ml (6,7 mmol) trietyyliamiinia tiputussuppilon kautta. Tämän jälkeen kolviin lisättiin hitaasti 0,64 ml (6,7 mmol) vasta tislattua etyyliklooriformiaattia, joka oli liuotettu 3 ml:aan Na-kuivattua dioksaania. Jää-vesihaude poistettiin ja seoksen annettiin sekoittua magneettisekoittajalla huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

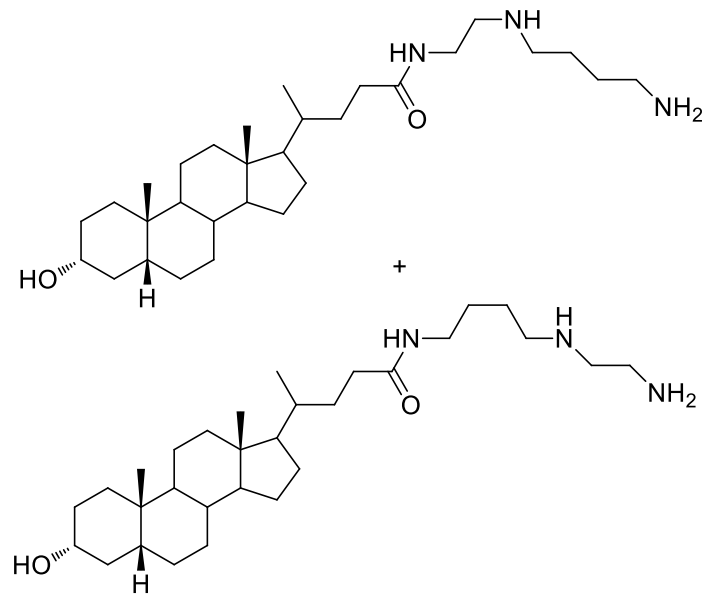
Tällä aikaa toisessa 100 ml:n kolmikaulakolvissa jäähdytettiin 10 ml DMF:a $0\text{ }^\circ\text{C}$:een suola-vesi-jäähautteen avulla. Kolviin lisättiin magneettisauva ja koko ajan sekoittaen 0,55 g (6,7 mmol) aminoetaanin hydrokloridia. Tämän jälkeen kolviin lisättiin tiputussuppilon kautta hitaasti 0,94 ml (6,7 mmol) trietyyliamidia. Suola-jää-vesihaude poistettiin ja seoksen annettiin sekoittua magneettisekoittajalla huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

DMF:iin liotettu aminoetaani lisättiin tipoittain ensimmäiseen kolviin, joka sisälsi litokoolihapon anhydridin. Sekoittamista jatkettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin evaporoitiin pois rotavaporia käyttäen ja raakatuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri. Raakatuote puhdistettiin samalla tavalla kuin JA-004 synteesiohjeessa. Raakatuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri. Tämän jälkeen aloitettiin pylväspuhdistus. Pylväspuhdistusta varten kokeiltiin ohutlevykromatografian avulla eluenttia dikloorimetaani ja metanoli tilavuussuhteissa 96:4, 90:10 ja 88:12. Näistä valittiin tilavuussuhde 96:4, joka oli paras yhdistelmä. Pylväaseen asetettiin pala pumpulia, jotta kiinteä faasi pysyy paikallaan. Pylvästä varten valmistettiin eluentista ja silica-geelistä jähmeäkö seos. Pylvästä kerättiin koeputkiin yhteensä 76 fraktiota. Tämän jälkeen joka toisesta fraktiosta ajettiin ohutlevyt, joiden perusteella päätettiin, mitkä fraktiot yhdistetään. Yhdistetyistä fraktioista mitattiin ^1H NMR-spektrit, joiden vertailun perusteella päätettiin missä fraktiossa on puhdasta tuotetta. Lopuksi tuote kuivattiin vakuuminlinjassa.

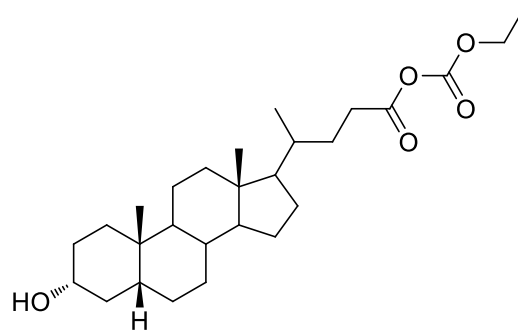
12. SYNTETISOIDUT MOLEKYYLIT



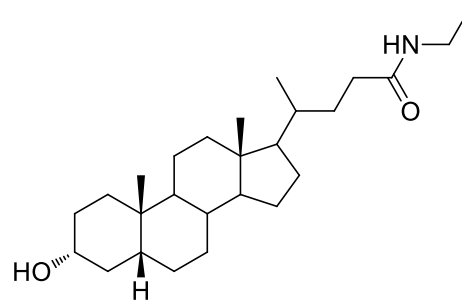
Kuva 15: Metyylilitokolaatti



Kuva 16: Litokoolihapon spermidiiniamidi



Kuva 17: Litokoolihapon anhydridi



Kuva 18: Litokoolihapon etyyliamidi

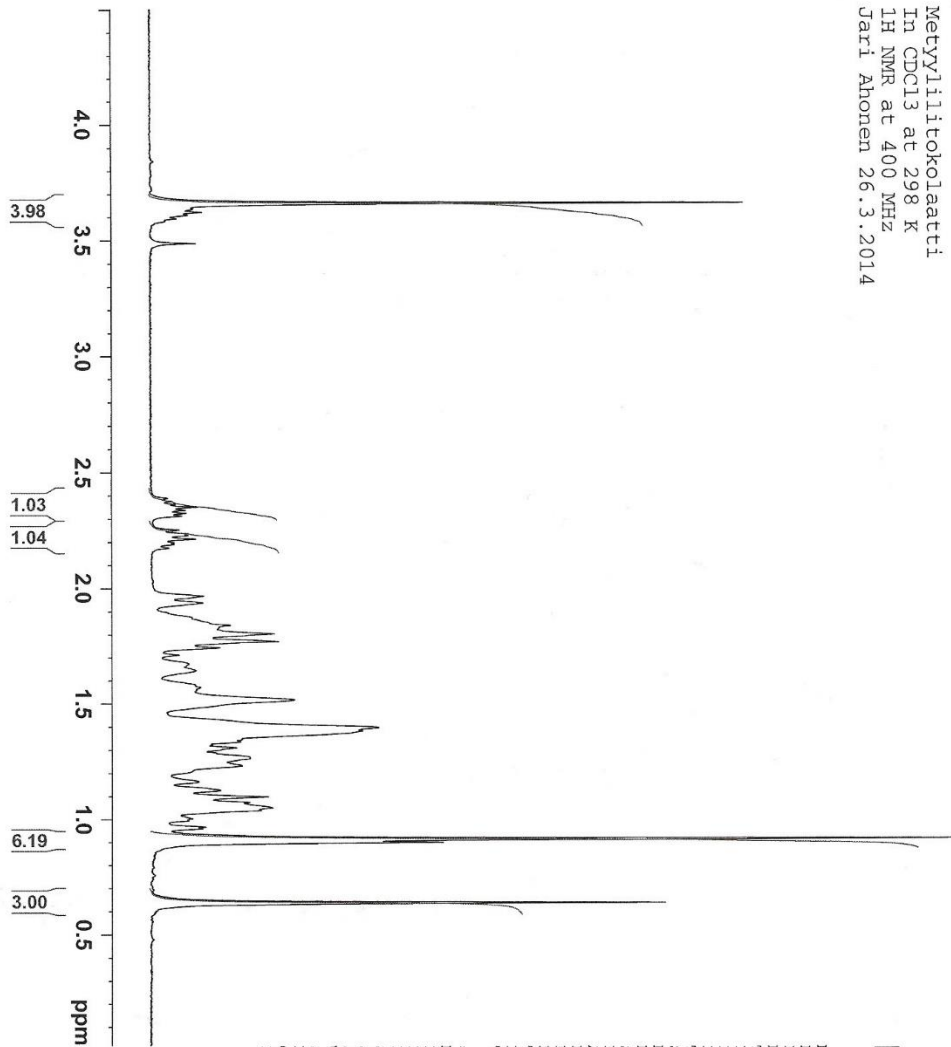
13. KIRJALLISUUSLUETTELO

1. A. F. Hofmann ja L. R. Hagey, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics, *Cell.Mol.Life Sci.* **2008**, *65*, 2461-2483.
2. J. Sjövall, Fifty years with bile acids and steroids in health and disease. *Lipids.* **2004**, *39*, 703-722.
3. P. B. Hylemon, H. Zhou, W. M. Pandak, S. Ren, G. Gil ja P. Dent, Bile acids as regulatory molecules, *Journal of Lipid Research.* **2009**, *50*, 1509-1520.
4. H. Sobotka, *The Chemistry of the Steroids*, Williams and Wilkings, Baltimore, 1938.
5. Minna Tolonen, *Sappihappojen aminohappo- ja oligopeptidikonjugaatit*, Jyväskylän yliopisto, Jyväskylä, 2012.
6. E. Haug, O. Sand, Ø. V. Sjaastad, K. C. Toverud ja K. Sillman, *Ihmisen fysiologia*, 5. painos, Sanoma Pro, Helsinki, 2012.
7. E. Sievänen, Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design, *Molecules.* **2007**, *12*, 1859-1889.
8. J. E. Gautrot ja X. X. Zhu, Shape Memory Polymers Based on Naturally-Occurring Bile Acids, *Macromolecules.* **2009**, *42*, 7324-7331.
9. J. W. Zhang ja X. X. Zhu, Biomaterials made of bile acids, *Science of China series: Chemistry.* **2009**, *52*, 849-861.
10. J. E. Gautrot ja X. X. Zhu, Biodegradable polymers based on bile acids and potential biomedical applications, *Journal of Biomaterial science, Polymer Edition.* **2006**, *17*, 1123-1139.
11. Biomedical engineer: Job description, http://www.prospects.ac.uk/biomedical_engineer_job_description.htm, Prospects - the UK's official graduate careers website, (17.2.2014).
12. Biolääketiede ja tekniikka - entistä parempia varaosia ihmisille, <http://www.aka.fi/fi/T/Tiedetapahtumat/Tiedeviikko-2012/Biolaaketiede-ja-tekniikka--entista-parempia-varaosia-ihmiselle/>, Suomen akatemia, (17.2.2014).
13. C. A. Bode, T. Bechet, E. Prodhomme, K. Gheysen, P. Gregoir, J. C. Martins, C. P. Muller ja 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.
14. S. Tolle-Sander, K. A. Lentz, D. Y. Maeda, A. Coop ja J. E. Polli, Increased Acyclovir Oral Bioavailability via a Bile Acid Conjugate, *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 40-48.

15. S. Gouin, X. X. Zhu ja S. Lehnert, New Polyanhydrides Made from a Bile Acid Dimer and Sebacic Acid: Synthesis, Characterization, and Degradation, *Macromolecules*. **2000**, *33*, 5379-5383.
16. M. A. Gauthier, P. Simard, Z. Zhang and X.X. Zhu, Bile acids as constituents for dental composites: in vitro cytotoxicity of (meth) acrylate and other ester derivatives of bile acids, *Journal of The Royal Society*. **2007**, *4*, 1145-1150.
17. Y. Ono, A. Kawase, H. Watanabe, A. Shiraisi, S. Takeda, Y. Higuchi, K. Sato, T. Yamauchi, T. Mikami, M. Karo, N. Tsugawa, T. Okano ja N. Kubodera, Syntheses and preventive effects of analogues related to 1 α ,25-dihydroxy-2 β -(3-hydroxypropoxy)vitamin D3 (ED-71) on bone mineral loss in ovariectomized rats, *Bioorg. Med. Chem*. **1998**, *6*, 2517–2523.
18. P.S. Pandey ja R.B. Singh, Synthesis of a head to head cholaphane, *Tetrahedron Lett*. **1997**, *38*, 5045–5046
19. P.S. Pandey, R. Rai ja R.B. Dingh, Synthesis of cholic acid-based molecular reseptors: head to head cholaphanes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. **2002**, 918–923.
20. J. Tamminen, E. Kolehmainen, J. Linnanto, P. Vainiotalo, S. Vuorikoski ja R. Kauppinen, ¹³C, ¹⁵N and ¹¹³Cd NMR and molecular orbital studies of Novel Bile Acid N-(2-aminoethyl)amides as Their Cd²⁺-complexes, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem*. **2000**, *37*, 121–130
21. S. Bergstrom ja A. Norman, Synthesis of Conjugated Bile Acids and Steroids, *Acta Chem. Scand*. **1953**, *7*, 1126-1127.
22. E. Virtanen, J. Tamminen, J. Linnanto, P. Mänttari, P. Vainiotalo ja E. Kolehmainen, Synthesis, ¹H, ¹³C, ¹⁵N, and ¹¹³Cd 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.
23. V. Noponen, Nonappa, M. Lahtinen, A. Valkonen, H. Salo, E. Kolehmainen ja E. Sievänen, Bile acid–amino acid ester conjugates: gelation, structural properties and thermoreversible solid to solid phase transition, *Soft Matter*. **2010**, *6*, 3789–3796.
24. V. Noponen, A. Valkonen, M. Lahtinen, H. Salo ja E. Sievänen, Self-assembly properties of bile acid derivatives of L-cysteine, L-valine, and L-serine alkyl esters, *Supramol. Chem.*, **2013**, *5*, 133-145.

JA-001 – Metyylilitokolaatin NMR-spektri

Metyylilitokolaatti
 In CDCl3 at 298 K
 1H NMR at 400 MHz
 Jari Ahonen 26.3.2014



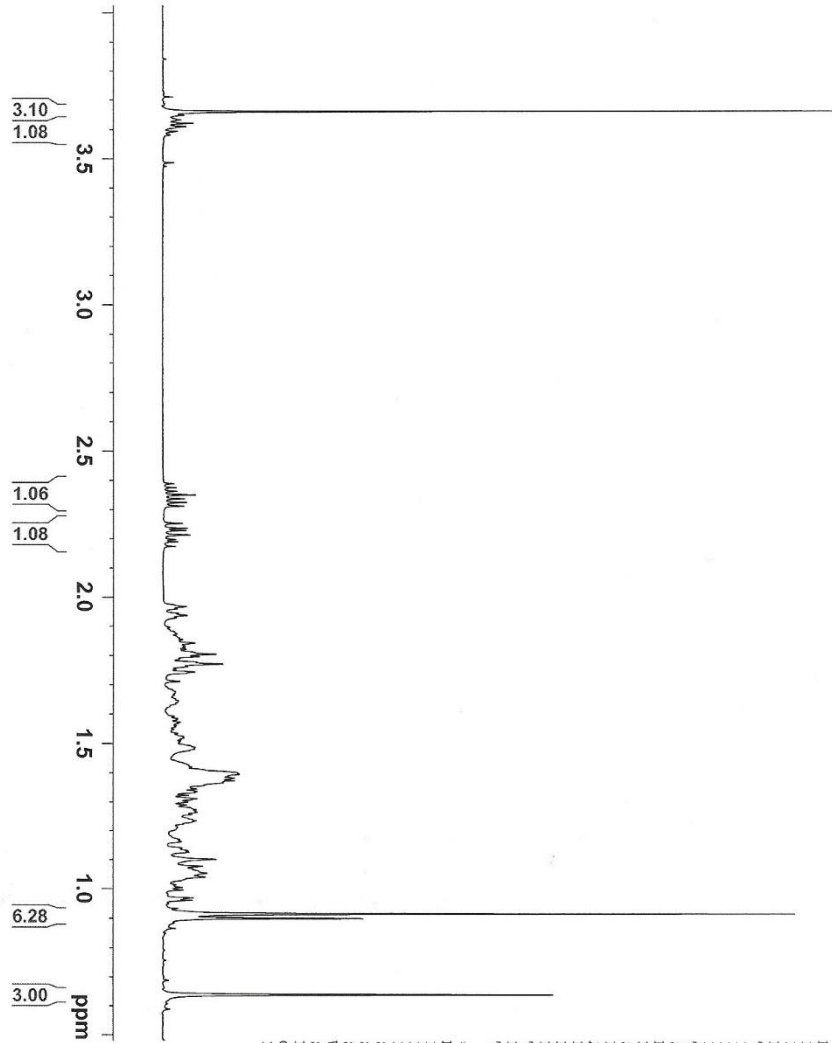
NAME JA-001
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 Date_ 20140326
 Time 11.28
 INSTRUM spect
 PROBD BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 4
 DS 0
 SWH 6410.256 Hz
 FIDRES 0.097813 Hz
 AQ 5.118579 sec
 RG 812.7
 DW 78.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 297.7 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 14.00 usec
 PL 2.00 dB
 PL1W 10.52368118 W
 SFO1 400.1328009 MHz
 ST 32768
 SF 400.1300093 MHz
 WDM EX
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



JA-005 – Metyylilitokolaatin NMR-spektri

Metyylilitokolaatti
 1m CDCl3 at 298 K
 1H NMR at 400 MHz
 Jari Ahonen 9.4.2014



BRUKER

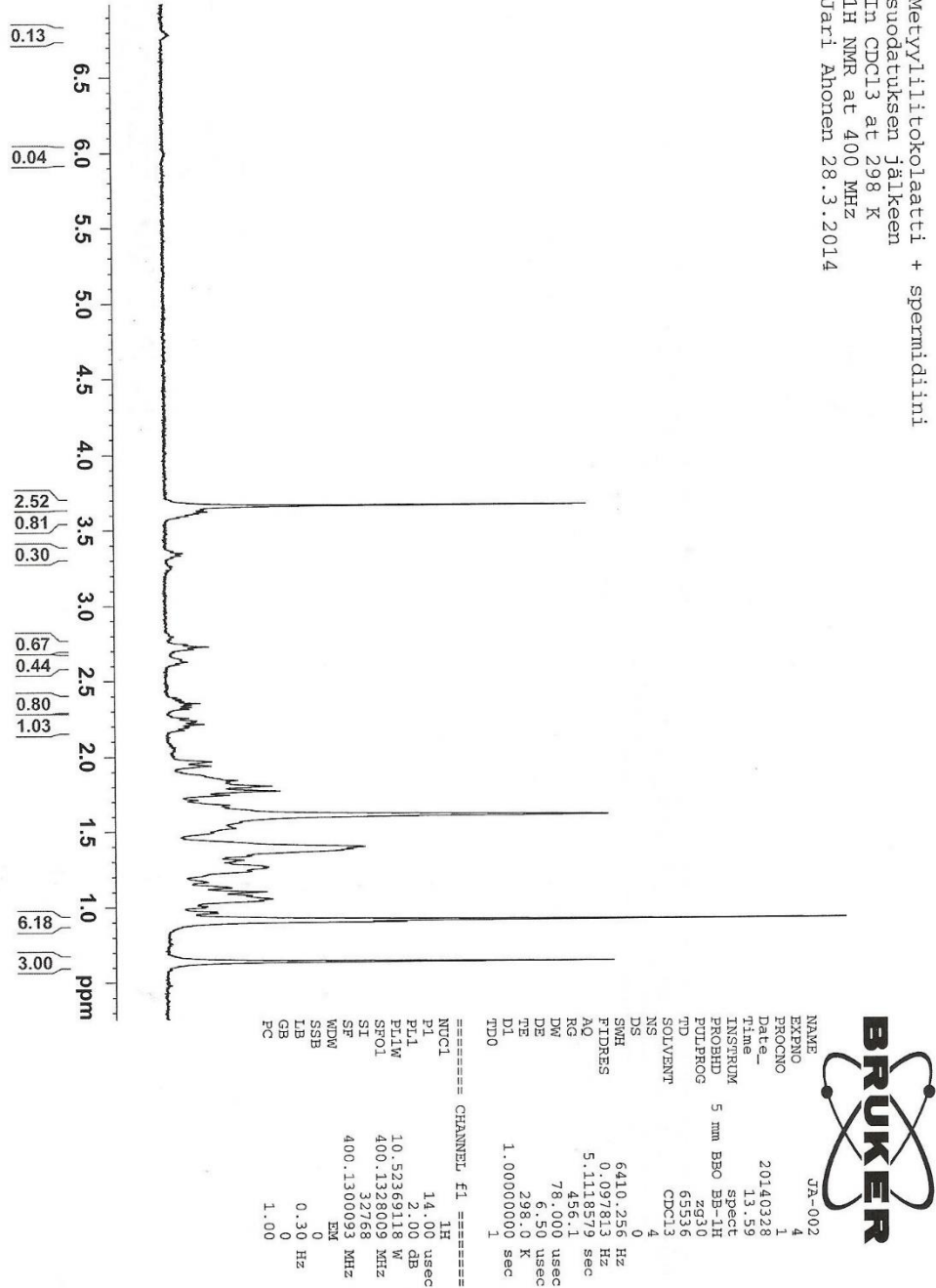
```

NAME          JA-005
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20140409
Time_         14.56
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm BBO BB-1H
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            4
DS            0
SWH           6430.256 Hz
FIDRES        0.097813 Hz
AQ            5.1118579 sec
RG            228.1
DW            78.000 usec
DE            6.50 usec
TE            299.0 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            14.00 usec
PL1           2.00 dB
PL1W         10.52369118 W
SFO1         400.1328009 MHz
SI           32768
SF           400.1300093 MHz
WDW          EM
SSB           0
LB           0.30 Hz
GB           0
PC           1.00
  
```

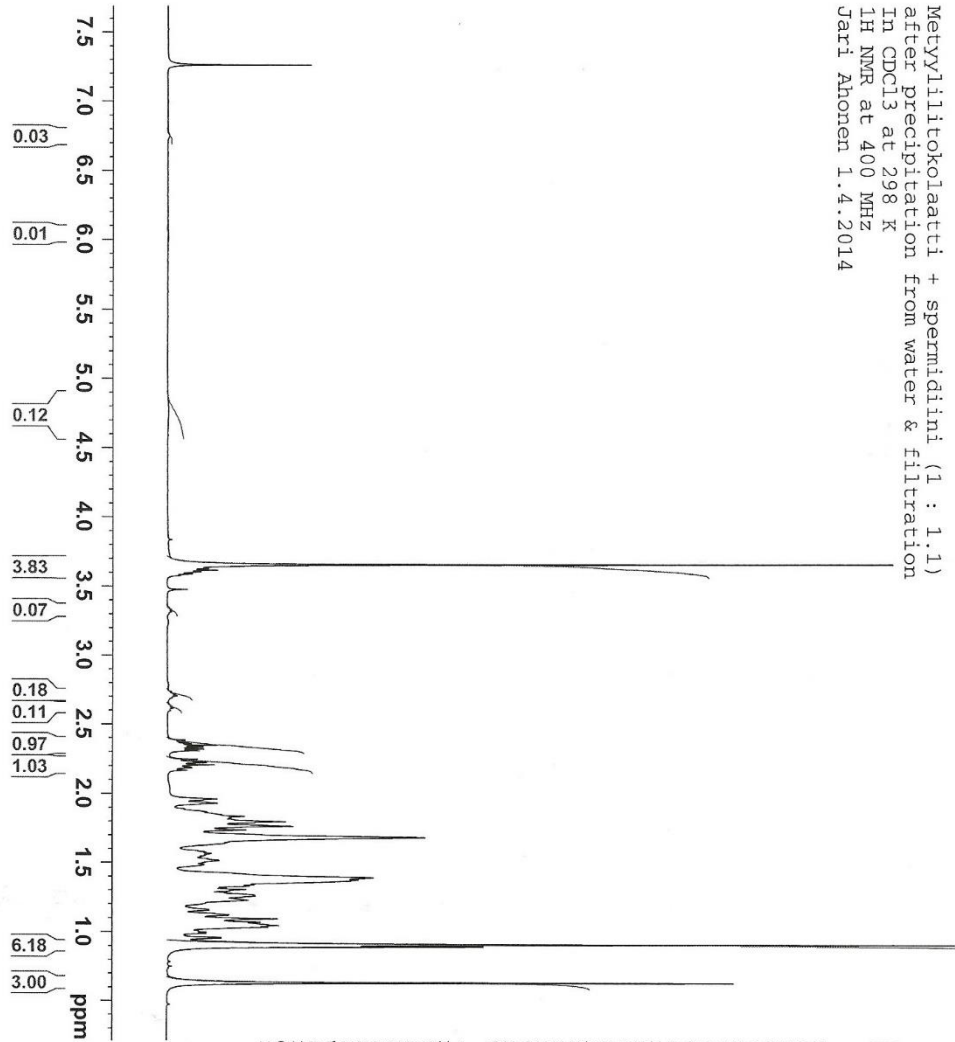
JA-002 – Litokoolihapon spermidiiniamiidi

Metyylilitokolaatti + spermidiini
 suodatuksen jälkeen
 In CDCl₃ at 298 K
 1H NMR at 400 MHz
 Jari Ahonen 28.3.2014



JA-003 – Litokoolihapon spermidiiniamidi

Metyyllitokolaatti + spermidiini (1 : 1.1)
 after precipitation from water & filtration
 in CDCl₃ at 298 K
 1H NMR at 400 MHz
 Jari Ahonen 1.4.2014



BRUKER

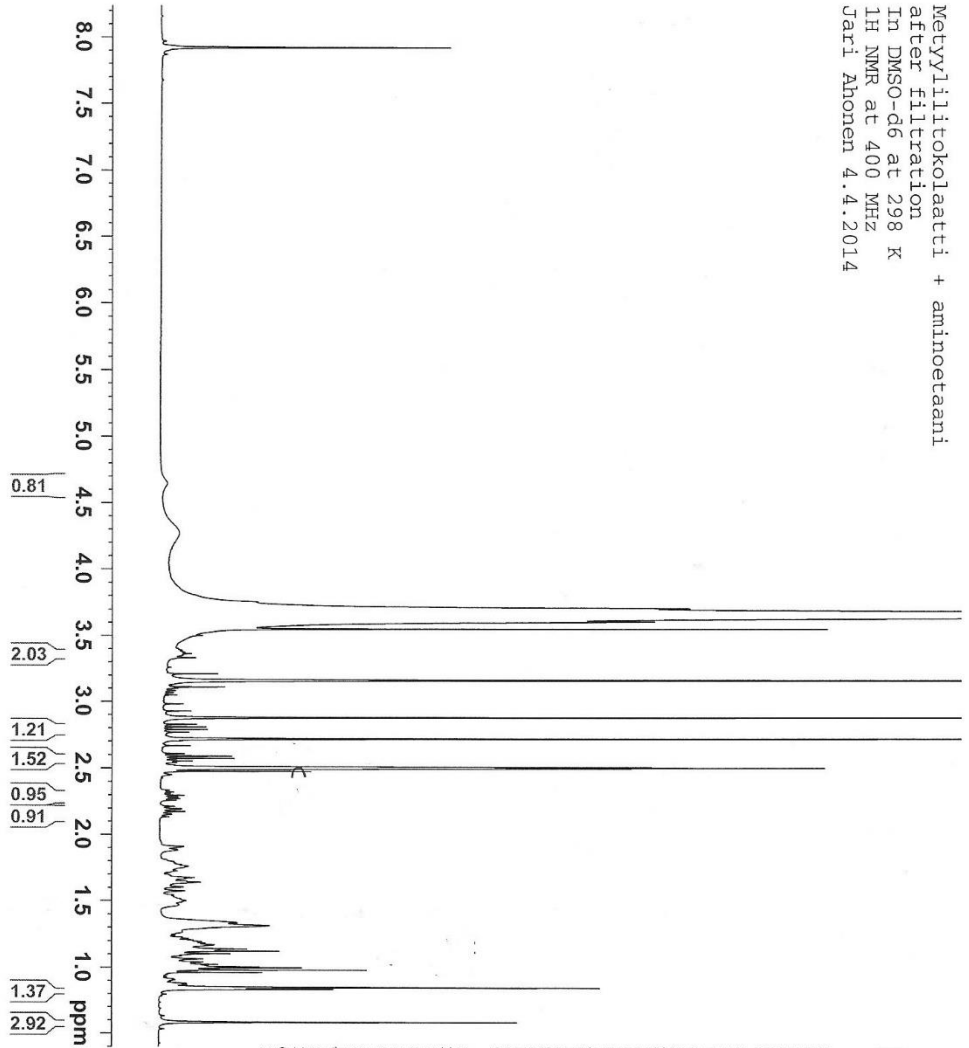
```

NAME          JA-003
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20140401
Time         12.43
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm BBO BB-1H
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            16
DS            0
SWH           6410.256 Hz
FIDRES        0.097813 Hz
AQ            5.118579 sec
RG            181
DVM           78.000 usec
DE            6.39 usec
TE            297.7 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            14.00 usec
PL1           2.00 dB
PL1W         10.52369118 W
SFO1          400.1328009 MHz
SI            32768
SF            400.1300093 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            0.05
  
```

JA-004 – Litokoolihapon etyyliamidin raakatuote

Metyyllitokolaatti + aminoetaani
 after filtration
 In DMSO-d6 at 298 K
 1H NMR at 400 MHz
 Jari Ahonen 4.4.2014

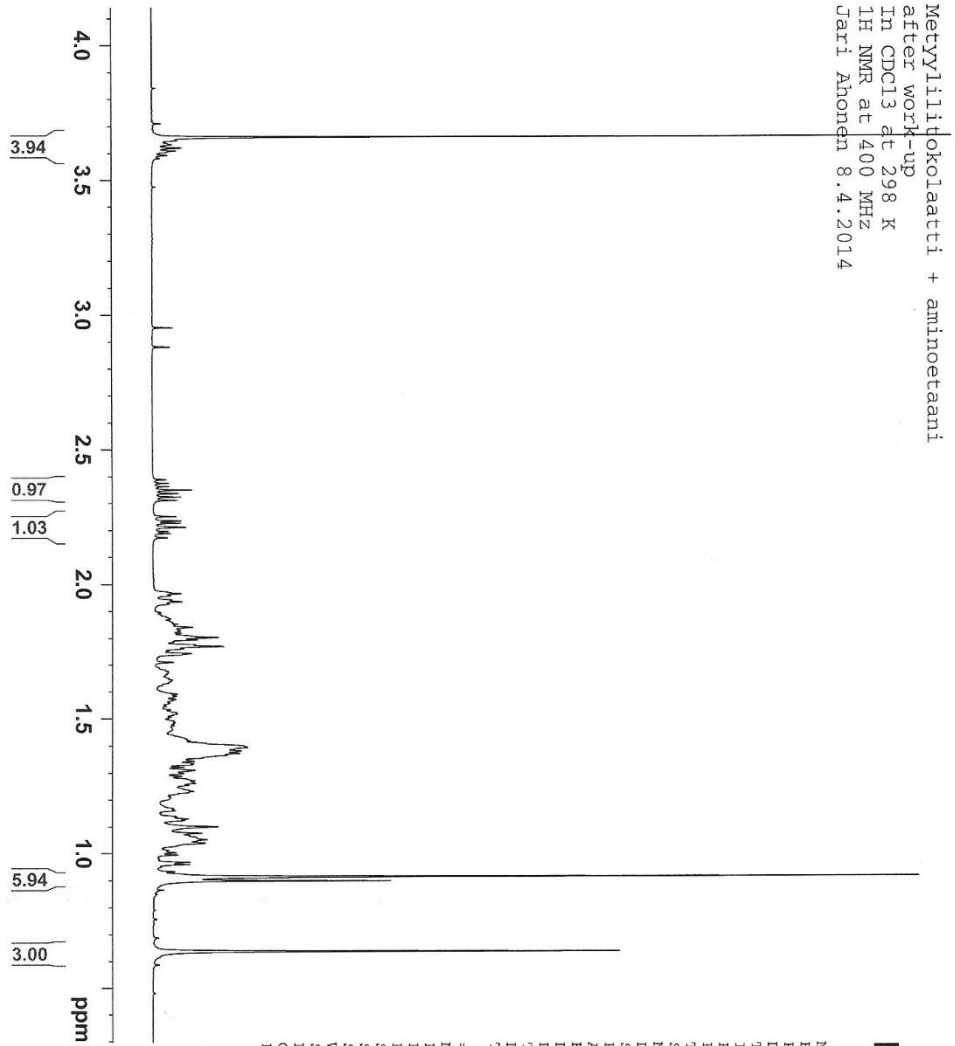


NAME JA-004
 EXPNO 5
 PROCNO 1
 Date_ 20140404
 Time 12.39
 INSTRUM spect
 PROBHD BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 16
 SWH 6410.256 Hz
 FIDRES 0.097813 Hz
 AQ 5.118579 sec
 RG 40.3
 DW 78.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL F1 =====
 NUCL 1H
 P1 14.00 usec
 PL1 2.00 dB
 PL1W 10.52369118 W
 SFO1 400.1328009 MHz
 SI 32768
 SF 400.1360026 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



JA-004 – Litokoolihapon etyyliamidi puhdistamisen jälkeen

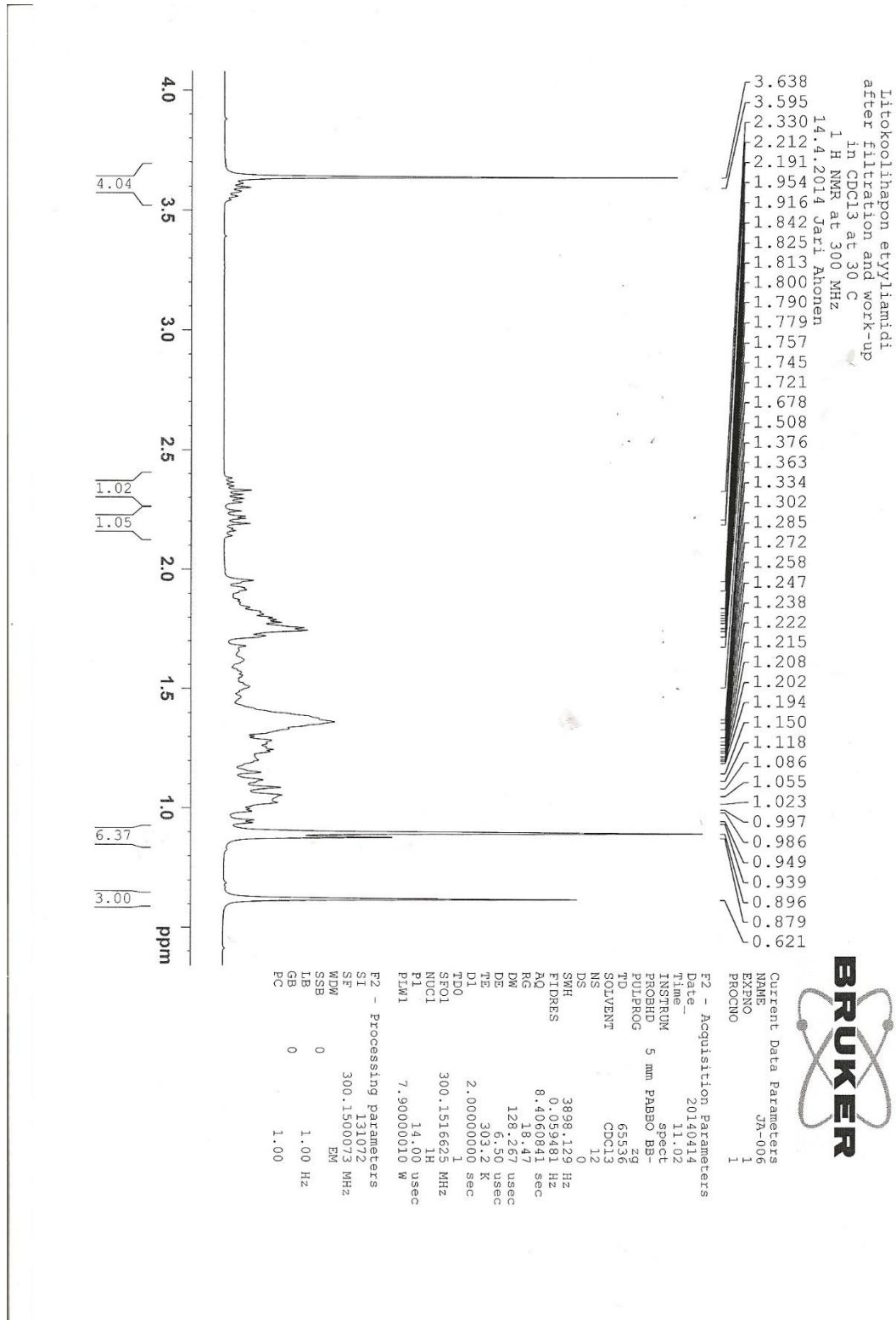


NAME JA-004
 EXPNO 6
 PROCNO 1
 Date_ 20140408
 Time 10.34
 INSTRUM spect
 PROBHD BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl₃
 NS 8
 DS 0
 SWH 6410.256 Hz
 FIDRES 0.097813 Hz
 AQ 5.118579 sec
 RG 228.1
 DW 78.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.5 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 14.00 usec
 PL1 2.00 dB
 PL1W 10.52369118 W
 SFO1 400.1328009 MHz
 ST 400.1328009 MHz
 SR 400.1300033 MHz
 WDM EX
 SSB 0
 TB 0.30 Hz
 GB 0
 FC 1.00



JA-006 – Litokoolihapon etyyliamidi puhdistamisen jälkeen



JA-007 – Litokoolihapon etyyliamidin NMR-spektri

