

**Bisfosfonaatit: valmistus, ominaisuudet ja lääketieteellinen
käyttö**

Pro gradu-tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Orgaanisen kemian osasto

10.5.2016

Silja Tarleena Majaharju

Tiivistelmä

Tutkielman kirjallisessa osassa perehdytään bisfosfonaatteihin, niiden ominaisuuksiin ja valmistukseen sekä käyttöön lääketieteessä. Bisfosfonaattien valmistuksessa perehdytään sekä itse bisfosfonaattien että niiden johdannaisten valmistukseen.

Bisfosfonaattien ominaisuuksia käydään läpi esittämällä niiden kemiallisia, biokemiallisia sekä farmakologisia ominaisuuksia ja vaikutustapoja. Eri bisfosfonaattien ominaisuuksia käsittelevät kappaleet on jaoteltu niistä käytettävän sukupolvijaottelun mukaisesti. Bisfosfonaattien käytössä pääosassa ovat niiden lääketieteelliset sovellukset. Bisfosfonaattien aihiolääkkeiden valmistuksessa keskitytään happoryhmän esteröintiin, amino- tai hydroksyyli ryhmän muokkaamiseen sekä makromolekyylien tai lääkeaineiden konjugoimiseen bisfosfonaatteihin.

Kokeellisen osan tavoitteena oli syntetisoida alendronaatin sappihappokonjugaatteja, bisfosfonaattien oraalisen biosaatavuuden parantamiseksi. Kun bisfosfonaatteja muokataan rasvaliukoisemmaksi, niiden imeytyminen ja turvallisuus parantuu.

Aluksi sappihapon karboksyyli ryhmä aktivoitiin muuttamalla se anhydridiksi. Anhydridin annettiin sitten reagoida natriumalendronaatin kanssa. Tavoitteena oli muodostaa amidisidos natriumalendronaatin aminoryhmän ja sappihapon karboksyyli hapon välille. Spektrien perusteella synteesien uskotaan onnistuneen, mutta täydellistä varmuutta ei asiasta saatu.

Esipuhe

Tämä tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla syyskuun 2014 ja huhtikuun 2016 välisenä aikana.

Kirjallisen osan aineisto on kerätty internetistä hakuina käyttäen eri kustantajien verkkojulkaisuja sekä esim. SciFinder ja Google Scholar -ohjelmia. Hakusanoina käytettiin mm. bisphosphonates, bisphosphonate prodrugs, synthesis of bisphosphonates ja mechanism of action of bisphosphonates sekä eri bisfosfonaatteja kuten alendronate, etidronate jne.

Työn ohjaajana toimi dosentti Elina Sievänen, jota haluan kiittää mielenkiintoiseen aiheeseen tutustuttamisesta, vailla vertaansa olevasta kannustamisesta, avustuksesta ja asiantuntevasta opastuksesta. Lisäksi haluan kiittää Esa Haapaniemeä avusta NMR-spektrien mittaamisessa, Elina Kaleniusta avusta MS-spektrien mittaamisessa, Petri Turhasta ja Jouko Vepsäläistä Itä-Suomen yliopistosta neuvoista ja artikkelivinkeistä sekä osastojen laboratoriomestareita ja muuta henkilökuntaa kaikesta avusta mitä olen tarpeen vaatiessa saanut.

Lisäksi haluan kiittää perhettäni, Joonasta ja kaikkia ystäviäni kärsivällisestä tuesta ja avusta sekä kannustuksesta opintojeni aikana.

Sisällysluettelo

1	Bisfosfonaatit	1
2	Bisfosfonaattien ominaisuuksia.....	2
3	Bisfosfonaattien vaikutustapa	4
4	Bisfosfonaattien käyttö.....	6
4.1	Bisfosfonaattien lääketieteellinen käyttö.....	6
4.2	Haittavaikutukset	8
4.2.1	Yleiset ja lyhyen ajan haittavaikutukset.....	8
4.2.2	Harvinaiset ja pitkän ajan haittavaikutukset.....	9
5	Ei-tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit ja niiden vaikutusmekanismi.....	11
5.1	Ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatit	12
5.1.1	1-Hydroksietylidenibisfosfonaatti	12
5.1.2	Dikloorimetylibisfosfonaatti	13
5.1.3	Hydroksimetyleenibisfosfonaatti	13
5.1.4	4-Kloorifenyylietylibisfosfonaatti.....	14
6	Tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit ja niiden vaikutusmekanismi	15
6.1	Toisen sukupolven bisfosfonaatit	17
6.1.1	(4-Amino-1-hydroksibutylideeni)bisfosfonaatti	17
6.1.2	(6-Amino-1-hydroksiheksylideeni)bisfosfonaatti ja (3-amino-1-hydroksipropylideeni)bisfosfonaatti.....	18
6.1.3	(3,3-Dimetyyliamino-1-hydroksipropylideeni)bisfosfonaatti ja [1-hydroksi-3-(metyylipentyyliamino)propylideeni]bisfosfonaatti	18
6.1.4	(Sykloheptyyliamino)metylibisfosfonaatti.....	19
6.2	Kolmannen sukupolven bisfosfonaatit	20
6.2.1	[1-Hydroksi-2-(imidats-1-yyli)etylideeni]bisfosfonaatti.....	20
6.2.2	[1-Hydroksi-2-imidatso(1,2a)-pyridin-3-yylietylideeni]-bisfosfonaatti ja [1-hydroksi-2-(3-pyridinyyli)etylideeni]-bisfosfonaatti.....	21
7	Bisfosfonaattien valmistus	22

7.1	Bisfosfonihappojen valmistus karboksyyli- ja aminohapoista	22
7.2	Bisfosfonihappojen valmistus amiineista ja amideista	24
7.3	Bisfosfonihappojen valmistus alkyneistä ja nitrileistä	25
7.4	Bisfosfonihappojen valmistus imiineistä ja imiinien kaltaisista yhdisteistä.....	26
7.5	Bisfosfonaattien valmistus bisfosfinaateista hapettamalla	27
7.6	Bisfosfonaattien valmistus mikroaaltojen avulla.....	27
8	Bisfosfonaattien aihiolääkkeet	29
8.1	Alendronaattijohdannaiset	30
8.2	Etidronaattijohdannaiset	31
8.3	Klodronaattijohdannaiset.....	33
8.4	Aromaattiset hydroksibisfosfonaattiesterit	36
8.5	Bisfosfonaattien konjugointi muihin lääkeaineisiin tai makromolekyyleihin ..	38
8.5.1	Peptidyli-alendronaatti- ja -pamidronaattijohdannaiset	39
8.5.2	Bisfosfonaattien konjugointi kamptotesiiniin ja tryptofaaniin	39
8.5.3	Hyaluronaani-bisfosfonaattikonjugaatit	42
8.5.4	Fluorokinoni-bisfosfonaattikonjugaatit.....	45
8.5.5	Diklofenaakki-bisfosfonaattikonjugaatit	47
8.5.6	Estradioli-bisfosfonaattikonjugaatit	48
8.5.7	Sisplatiini-bisfosfonaattikonjugaatit.....	50
9	Yhteenveto	53
10	Työn tarkoitus	57
11	Kokeellinen osa.....	58
11.1	Menetelmät ja laitteet.....	58
11.2	Käytetyt reagenssit ja liuottimet	58
11.3	Synteesit.....	59
11.3.1	Alendronaatin sappihappojohdannaiset.....	59
11.3.2	Etidronaatin sappihappojohdannaiset.....	61
12	Tulokset ja niiden tarkastelu	62

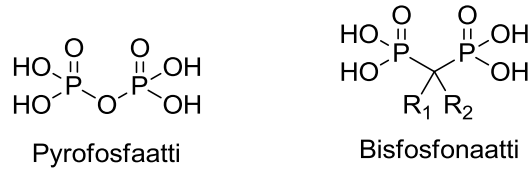
12.1	Alendronaatin litokoolihappokonjugaatti	62
12.2	Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti.....	63
12.3	Alendronaatin koolihappokonjugaatti.....	64
12.4	Alendronaatin ursodeoksikoolihappokonjugaatti	65
12.5	Alendronaatin deoksikoolihappokonjugaatti	65
12.6	Etidronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti.....	65
13	Yhteenveto	67
14	Synteesiohjeet.....	68
14.1	Alendronaatin litokoolihappokonjugaatti	68
14.2	Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti.....	69
14.3	Alendronaatin koolihappokonjugaatti.....	70
14.4	Alendronaatin ursodeoksikoolihappokonjugaatti	71
14.5	Alendronaatin deoksikoolihappokonjugaatti	71
15	Syntetisoidut yhdisteet	73
16	Kirjallisuusluettelo	74
	Liitteet	

Käytetyt lyhenteet

ADP	Adenosiinidifosfaatti
ALE	Alendronaatti
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BP	Bisfosfonaatti
DEBP	Dietyylimetyylibisfosfonaatti
DMF	Dimetyyliformamidi
DTT	Ditiotreitoli
FDA	Food and Drug Administration
FPP	Farnesyylipyrofosfaatti
GTP	Guanosiinitrifosfaatti
HA	Hyaluronihappo
HAP	Hydroksiapatiitti
<i>in vitro</i>	Tutkimustekniikka, joka suoritetaan elävän organismin tai solun ulkopuolella (kuten esim. koeputkessa tai maljoilla)
<i>in vivo</i>	Tutkimustekniikka, joka suoritetaan elävässä organismissa tai solussa
IPP	Isopentenyylipyrofosfaatti
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PTH	Parathormoni
TMSBr	Bromitrimetyylisilaani

1 Bisfosfonaatit

Bisfosfonaatit (BP), joita aiemmin kutsuttiin myös difosfonaateiksi, ovat yhdisteitä, jotka tunnistaa P-C-P-sidoksesta. Ne ovat pyrofosfaattien kaltaisia yhdisteitä, joissa on hiiliatomi happiatomin sijaan (Kuva 1).



Kuva 1. Pyrofosfaatin ja yleinen bisfosfonaattien rakenne.

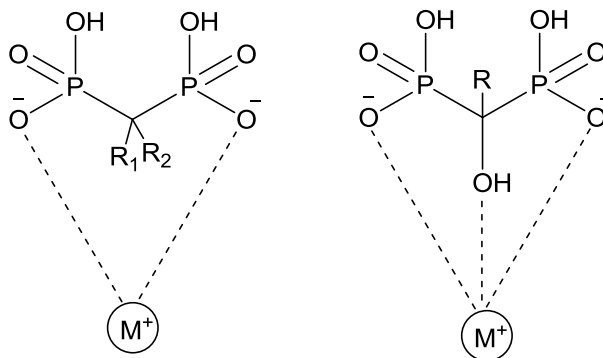
Pyro- ja polyfosfaatteja on jo vuosikymmeniä käytetty estämään kalkkeumia, lisäaineina pesuaineissa, aktiivisena osana hammaskiveä ehkäisevissä hammastahnoissa sekä poistamaan vedessä olevia kalsiumkarbonaattisaostumia. Pyrofosfaatteja ja emäksisiä fosfataaseja esiintyy luonnostaan plasmassa, virtsassa, hampaissa ja luussa, mutta niitä ei voida käyttää lääkeaineina niiden nopean hajoamisen takia.¹

Bisfosfonaatteja on syntetisoitu ensimmäisen kerran jo 1800-luvun lopulla, mutta vielä silloin niille ei ollut kaupallista tarkoitusta. Ensimmäisen kerran niitä käytettiin mm. pesuaineissa sitomaan kalsiumia ja magnesiumia, mutta lääketieteelliseen käyttöön ne tulivat vasta 1960-luvulla. 1960-luvun alussa Procter & Gamblen tutkijat tutkivat fluoridin käyttäytymistä hammaskiilteessä ja hammasluussa etsiessään keinoa karieksen ehkäisyyn. Tutkimuksissaan he löysivät yhdisteitä, jotka muuttivat happaman fluoridin vaikutuksia radikaalisti kiillotetun hammaskiilteen pinnalla. Yhdisteet muuttivat fluoridin syövyttävän vaikutuksen ja suurien CaF₂-kiteiden muodostumisen ultraohueksi, tiiviisti pakatuksi kerrokseksi amorfista CaF₂:a. Tämä ohut kerros suojasi hammaskiillettä syöpymiseltä säilyttäen karieselta ehkäisevän vaikutuksensa. Samaan aikaan näiden tutkimusten kanssa P&G:ssä tutkittiin kalsiumia kelatoivien tekijöiden vaikutusta hammaskiven poistoon. Tämän ja muiden tutkimusten jälkeen aloitettiin tutkimusprojekteja bisfosfonaattien kemiallisten ja biologisten ominaisuuksien selvittämiseksi. Euroopassa bisfosfonaatit otettiin 1990-luvulla käyttöön hyperkalsemian ja syöpäpotilaiden luuongelmien hoitoon.²⁻⁴

2 Bisfosfonaattien ominaisuuksia

Bisfosfonaatit ovat erittäin hydrofiilisiä, koska niillä on ionisoituvat fosfonaattihapporyhmät rungossaan. Yleisesti ne ovatkin hyvin happamia, ja yksinkertaisimmat bisfosfonaatit sisältävät jopa neljä hapanta protonia. Fosfonaattiryhmän ensimmäisen protonin pK_a -arvo on alle 1, toisen n. 2,5, kolmannen välillä 6-7 ja neljännen yli 10. Jos keskushiilessä toisena R-ryhmänä on hydroksyyli-ryhmä, sen protoni on erittäin heikosti hapanta eikä se deprotonoidu pH:n ollessa alle 13. Bisfosfonaattirunkoa voidaan muokata monin eri tavoin. Fosfaattiryhmiä voidaan muokata esimerkiksi esteröimällä ja keskushiileen kiinnittyneisiin kahteen muuhun ketjuun voidaan liittää melkein minkälaisia hiiliketjuja tahansa. P-C-P-sidokset kestävät kuumuutta ja useimpia kemiallisia reagensseja, mutta ovat myös täysin resistenttejä entsymaattiselle hydrolyysille. UV-valon vaikutuksesta ne voivat kuitenkin hydrolysoitua.^{2, 3, 5, 6}

Bisfosfonaateilla on suuri affiniteetti metallikationeille, kuten esimerkiksi kalsiumia kohtaan. Bisfosfonaatit voivat sitoa kationeja kaksi- ja kolmihampaisesti (Kuva 2).

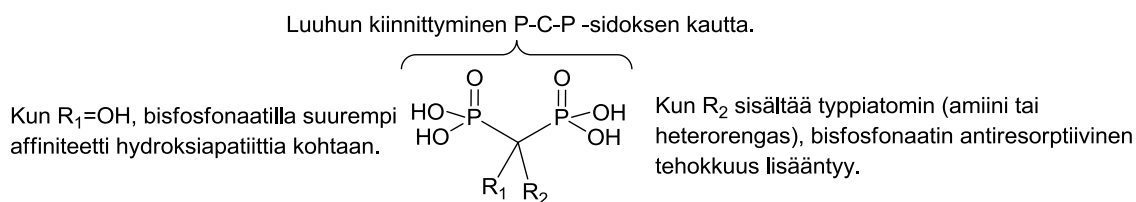


Kuva 2. Bisfosfonaattien kaksi- ja kolmihampainen sitoutuminen.

Kolmihampainen sitoutuminen on voimakkaampaa. Metallikationien kanssa bisfosfonaatit voivat muodostaa sekä liukenevia että liukenemattomia komplekseja ja yhdistelmiä riippuen liuoksen pH:sta ja metallikationista. Bisfosfonaattien luuhun kiinnittyminen tapahtuu näiden kaksi- ja kolmihampaisten sitoutumisten ansiosta ja näiden on oletettu olevan vastuussa myös niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista, joista tärkeimpänä pidetään kalsiumkiteiden kasvun estoa. Luuhun kiinnittyminen on edellytys antiresorptiiviselle aktiivisuudelle, vaikkakin kahdella saman luuhun kiinnitymisaffiniteetin omaavalla bisfosfonaatilla voi olla huomattavan erilaiset antiresorptiiviset ominaisuudet.¹⁻³

Bisfosfonaatteja on tutkittu paljon, koska niiden on huomattu vaikuttavan ihmisten ja eläinten luihin. Jokaisella bisfosfonaatilla on oma fysikokemiallinen ja biologinen profiilinsa. Biologisissa systeemeissä bisfosfonaatit sitoutuvat kemiallisesti kalsiumiin, jota on luiden ja hampaiden hydroksiapatiitissa, sekä pehmeiden kudosten kalkkeutumisiin. Kiinnittymällä luiden hydroksiapatiittikiteisiin bisfosfonaatit estävät sekä luiden kasvua, että niiden liukenemistä.^{2, 3, 7}

Bisfosfonaatit voidaan jaotella eri tavoin. Yleisesti ne jaotellaan sen mukaan, sisältääkö yhdiste typpiä vai ei. Joskus ne jaotellaan myös sen mukaan, minkä sukupolven lääkeaineita ne ovat tai miten ne vaikuttavat luuhun. Bisfosfonaattien antiresorptiiviset ominaisuudet 100-kertaistuvat sukupolvien välillä *in vitro*, mutta vain 10-kertaistuvat *in vivo*. Bisfosfonaattien biologinen aktiivisuus riippuu paljon hiiliatomin kahdesta sivuketjusta (Kuva 3).

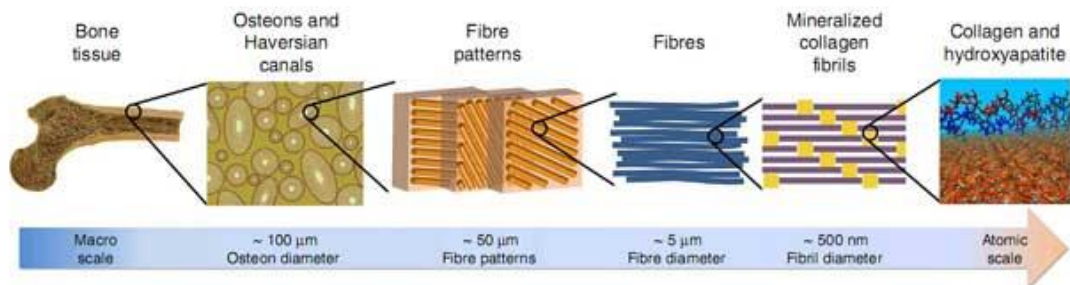


Kuva 3. Bisfosfonaattien aktiivisuus.

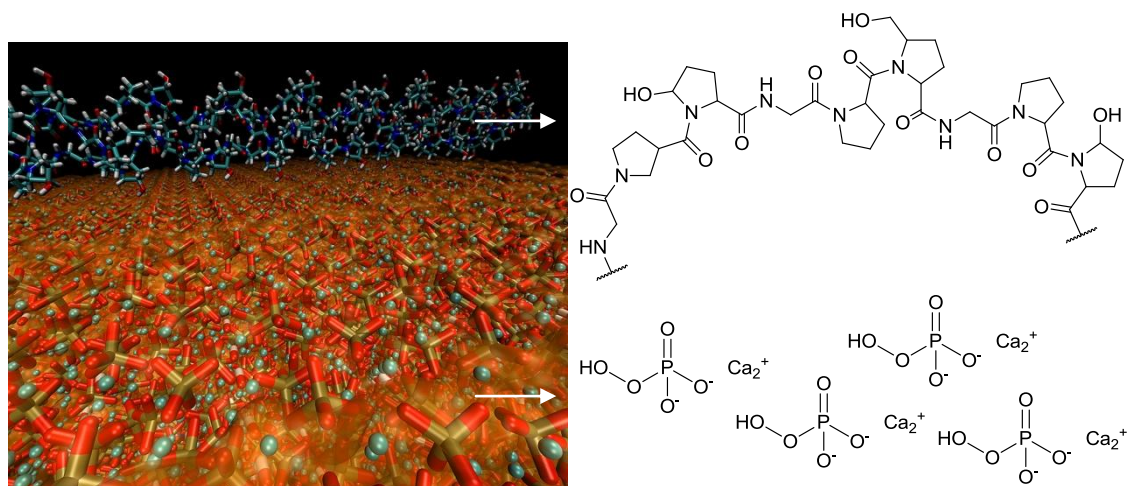
Luuhun kiinnittyminen tapahtuu P-C-P-sidoksen kautta. Kiinnittymistä parantaa, mikäli toinen sivuketju on hydroksyyli- tai primäärinen aminoryhmä, koska tämä mahdollistaa kolmihampaisen konfiguraation ja tehokkaamman sitoutumisen Ca^{2+} -ioniin. Toisen sivuketjun rakenne ja kolmiulotteinen konfiguraatio määräävät bisfosfonaatin vaikutuksen soluihin ja niiden inhibointitehokkuuden luun resorptiolle. Kun toisen sivuketjun alkyyliketjuun lisätään primäärinen typpi, molekyylin antiresorptiivinen vaikutus satakertaistuu. Yhdisteissä, joiden alkyyliketjuissa on tertiäärinen typpi, vahvuus on moninkertaistunut vielä lisää. Tämän päivän lupaavimpia bisfosfonaatteja ovat ne, joissa on typpi heterosyklisessä renkaassa.^{2-4, 8}

3 Bisfosfonaattien vaikutustapa

Luun koostumuksesta n. 65 % on mineraalia, hydroksiapatiittia. Noin 35 % on erilaista väliainetta, joka suurimmaksi osaksi on kollageenia. Näiden lisäksi luu sisältää erilaisia soluja ja vettä. Tietyillä aineilla, kuten bisfosfonaateilla, on erityinen affiniteetti kalsiumvajaaseen apatiittiin, jota esiintyy luun mineraaleissa. Apatiitti käsittää tässä tapauksessa yleisesti ne ainekset, jota luussa esiintyy, kuten fosfaatin, sitraatin, karbonaatin, natriumin, magnesiumin, fluoridin ja strontiumin. Ne joko sisältyvät luun kiderakenteeseen tai absorboituvat siihen (Kuvat 4 ja 5).²



Kuva 4. Kuvasuurennos luun rakenteesta.⁹



Kuva 5 . Kuva kollageenin ja hydroksiapatiitin rakenteista ja vuorovaikutuksesta.¹⁰

Bisfosfonaatit pienentävät aktiivisuutta, eli taajuutta jolla uuden luun uudet rakennusyksiköt saadaan aikaan. Toisessa vaikutustavassa bisfosfonaatit kiinnittyvät luun pintaan ja vapautuvat osteoklastien, luun syöjäsolujen muodostamassa happamassa ympäristössä. Kun bisfosfonaatit saavuttavat osteoklastit, ne saavat osteoklastin entsyymien tuotannon pienemmään, mikä estää osteoklastien luun resorption.

Bisfosfonaatit indusoivat myös osteoklastien apoptoosia. *In vitro*-testeissä bisfosfonaatit estävät erilaisten toimenpiteiden indusoimaa luun resorptiota solu- ja kudosisviljelyissä. Bisfosfonaatit vähentävät luiden hajoamista mm. pitkissä luissa ja vastasyntyneiden lasten kalloissa.^{2,4}

4 Bisfosfonaattien käyttö

4.1 Bisfosfonaattien lääketieteellinen käyttö

Bisfosfonaatteja käytetään erilaisten tuki- ja liikuntaelinsairauksien hoitoon, kuten esimerkiksi osteoporoosin, Pagetin taudin ja lihaksen luutumismuutoksen (luutuva myosiitti) hoitoon sekä syöpien luustometastaasien estämiseen. Menopausin aiheuttama estrogeenitason lasku indusoi luukatoa kahdella kolmesta naisesta. Estrogeenihoitoa voitaisiin käyttää menopausaalisen luukadon hoitoon, mutta sillä on havaittu olevan muita ikäviä sivuvaikutuksia, kuten epänormaalia vuotoa kohdussa ja rinta- tai kohtusyövän kehittymistä. Pagetin taudissa ilmenee paikallisia luuston rakennehäiriöitä. Normaali luunmuodostus häiriintyy ja syntyy muusta luusta erottuvaa poikkeavaa luuta. Lihaksen luutumismuutos kehittyy yleensä ajan kuluessa sen jälkeen, kun esimerkiksi reisi on saanut ruhjeen tai iskun. Oireisiin kuuluu mm. kova kipu lihaksessa urheilusuorituksen aikana. Urheilijan liikerata jalassa on rajoittunut ja syvällä lihaksessa voi tuntua kova patti. Luun kasvu voidaan havaita ja varmistaa röntgenin avulla. Neljä eniten käytettyä bisfosfonaattia ovat alendronaatti, etidronaatti, ibandronaatti ja risedronaatti.¹¹⁻¹⁵

Bisfosfonihappojen johdannaisia käytetään myös hammaslääketieteessä.¹⁶ Itse-etsautuvilla aineilla saadaan aikaan luja sidos vahvistavan komposiitin ja hammasaineksen välille. Ne ovat yleensä vesipohjaisia liuoksia, jotka pohjautuvat happamiin monomeereihin. Itse-etsautuvia sidosaineita käytetään hammaskiilteen ja luun etsaamiseen. Sidosaaineet sisältävät myös kemiallisia sidoksia muodostavia monomeereja, jotka kopolymeroituvat happamien polymeerien kanssa muodostaen liukenemattoman matriisin.

Bisfosfonaattilääkitys perustuu lääkeaineen hakeutumiseen luuhun ja kalsiumin sitoutumiseen siihen. Huonoin puoli bisfosfonaattien käytössä on niiden erittäin huono imeytyminen ruoansulatuskanavasta. Imeytyminen tapahtuu passiivisella diffuusiolla. Vain n. 1 % suun kautta annostellusta bisfosfonaatista imeytyy ja imeytymistä heikentää kalsiumin tai raudan samanaikainen läsnäolo. Siksi ateriointia ja maitotuotteiden käyttöä samanaikaisesti lääkkeen kanssa ei suositella. Kahvin tai appelsiinimehun juominen voi vähentää imeytymistä jopa 50 %. Suonensisäisesti biosaatavuus voi olla jopa 100 %. Absorboituneesta bisfosfonaatista 50 % imeytyy luuhun 12-24 tunnin aikana. Bisfosfonaatit, jotka eivät kiinnity luuhun, poistuvat elimistöstä munuaisten

kautta. Parantamalla bisfosfonaattien rasvaliukoisuutta lääkkeen imeytyminen paranisi. Bisfosfonaatit annetaan yleensä injektiona suoneen, koska lihakseen tai ihon alle injektoidessa voi ilmetä paikallista nekroosia. Suun kautta nautittuna bisfosfonaattien aiheuttama luun resorptioon vähentyminen havaitaan kolmen kuukauden kuluessa. Suonensisäisesti käytettynä suppressio voidaan havaita vielä nopeammin. Absorboitumisen jälkeen bisfosfonaatit poistuvat nopeasti verenkierrosta puoliintumisajan ollessa ≤ 1 h. Puolet bisfosfonaateista erittyy virtsaan ja puolet kiinnittyy luuhun, jossa puoliintumisaika voi olla yli vuoden.^{4, 5, 8, 17-19}

Bisfosfonaatit voivat muodostaa erilaisia metallisuoloja ja -komplekseja ruoansulatuskanavassa, mikä on yksi syy bisfosfonaattien erittäin heikkoon imeytymiseen. Osteoporoosin hoidossa imeytyminen vaihtelee tapauskohtaisesti ollen kuitenkin alle yhden prosentin. Kliinisesti imeytyminen on tehokasta, koska osteoporoosia hoidetaan kroonisesti ja suurin osa absorboituneesta lääkkeestä kiinnittyy luuhun.¹⁷

Typpeä sisältäviä bisfosfonaatteja on käytetty myös radionukleotidien kuljettajina, kun on kehitelty uusia sovelluksia luun kuvantamiseen. Tällöin bisfosfonaatti kiinnittyy teknetiumin isotooppiin, joka emittoi gammasäteilyä. Ensimmäinen teknetiumyhdiste, joka oli pelkistetyn teknetiumin ja natriumtripolyfosfaatin kompleksi, otettiin käyttöön 1971. Tämän jälkeen yhdiste kehittyi pitkäketjuiseksi, lineaariseksi polyfosfaatiksi ja tästä edelleen pyrofosfaatiksi. Poly- ja pyrofosfaatit hajoavat kuitenkin herkästi entsyymien, kuten fosfataasien vaikutuksesta, jolloin teknetium vapautuu kompleksista. Varsin nopeasti alettiinkin kehitellä yhdistettä, jossa bisfosfonaatti korvasi käytetyn pyrofosfaatin. Tämän Tc-BP-yhdisteen huomattiin poistuvan verestä nopeammin ja sitä kerääntyi luuhun enemmän.^{2, 6, 17, 20}

Suomessa bisfosfonaattilääkityksessä käytetään neljää bisfosfonaattia, joista kolme on tablettimuodossa ja yksi suoneen annettavassa muodossa. Suomessa käytettävät bisfosfonaatit ovat lääkenimiltään: Aclasta, Alendronat ratiopharm, Bonasol, Fosamax, Fosavance, Bonviva, Ibandronat ratiopharm, Optinate, Risedronat Sandoz/Teva ja Vionate. Tablettimuodossa käytettäviä bisfosfonaatteja ovat alendronaatti, risedronaatti ja ibandronaatti, joista alendronaattia voi saada oraaliliuoksenakin. Suoneen annettavassa muodossa Suomessa käytetään tsoledronaattia. Taulukossa 1 on esitetty Suomessa käytettävien bisfosfonaattien käyttökohteet ja annostelu.²¹⁻³²

Taulukko 1. Bisfosfonaattien käyttökohteita

Vaikuttava aine	Vaihdevuosisien jälkeinen osteoporoosi	Miesten osteoporoosi	Pagetin tauti	Luustoon levinnyt rintasyöpä
Natriumisedronaatti 1 tabletti/vko, 35 mg	•	•		
Natriumibandronaattimonohydraatti 1 tabletti/kk, 150 mg	• (Tavallista suurempi murtumisriski)			
Natriumibandronaattimonohydraatti 1 tabletti/vrk, 50 mg				•
Natriumalendronaattitrihydraatti 1 tabletti/vko, 70 mg + 70/140 mg D ₃ -vitamiinia	• (D-vitamiinin puutteen vaara)			
Natriumalendronaattitrihydraatti 100 ml:n oraaliliuos, 70 mg	•			
Tsoledronaatin monohydraatti 100 ml:n suonensisäinen liuos, 5 mg (kerran vuodessa)	•	•	•	

4.2 Haittavaikutukset

4.2.1 Yleiset ja lyhyen ajan haittavaikutukset

Suun kautta otetun bisfosfonaattihoidon alkuvaiheessa yleisin sivuvaikutus on ylemmän ruoansulatuskanavan ongelmat. Nämä johtuvat ruokatorvessa esiintyvistä tulehduksista tai turpoamisesta. Tämä johtuu yleensä siitä, ettei potilas ole pystynyt pitämään pystysuoraa istuma-asentoa lääkityksen aikana tai on nauttinut liian vähän vettä. Ruoansulatuskanavan oireet ovat yleisiä sivuvaikutuksia mm. etidronaatilla, klodronaatilla, pamidronaatilla ja alendronaatilla.^{4, 18}

Yhdellä kolmesta potilaasta voi esiintyä ohimenevää akuutin faasin reaktioita, kuten infektioita, 24-72 tunnin ajan ensimmäisen infuusion jälkeen. Tällöin oireina ovat mm. kuume, lihassärky ja nivelkipu. Toisella infuusiokerralla oireita saa yksi 15:stä ja

kolmannella kerralla yksi 35:stä. Tämä on kuitenkin harvinaisempaa suun kautta nautittavien bisfosfonaattien kohdalla.

Muita yleisiä haittavaikutuksia ovat kuume, huimaus, sumentunut näkökyky, punaiset tai ärtyneet silmät sekä päänsärky.³³ Bisfosfonaattien aiheuttama kuume on yleensä lievää ja ilmenee vain suonensisäisesti annetun lääkkeen jälkeen. Kuume voi kestää muutamia tunteja.

4.2.2 Harvinaiset ja pitkän ajan haittavaikutukset

Kaikkien bisfosfonaattien mahdolliseksi haittavaikutukseksi on listattu kipu tuki- ja liikuntaelimissä.¹⁸ FDA (Food and Drug Administration) on kuitenkin tarkentanut, että bisfosfonaatit voivat aiheuttaa vakavia ja jopa työkyvyn vieviä luu-, nivel- tai muskuloskeletaalikipuja, jotka voivat ilmetä jossain vaiheessa bisfosfonaattihoidon aloittamisen jälkeen. Riskitekijöitä tähän ei tunneta.

Hypokalsemiassa veren kalsiumpitoisuus on vähentynyt.³⁴ Tilapäistä hypokalsemiaa johtuen sekundäärisestä hyperparatyroosista on havaittu bisfosfonaatteja käyttävillä potilailla, mutta sen vaikutuksia on aliarvioitu. Hyperparatyroosi on lisäkilpirauhasen ulkopuolinen sairaus, joka saa lisäkilpirauhaset suurentumaan ja aktivoitumaan. Usein tämän saa aikaan munuaisvaurio, jolloin munuaiset eivät pysty poistamaan fosforia verestä ja tuottamaan tarpeeksi D-vitamiinia. Fosforin kasvanut määrä veressä saa kalsiumin määrän vähenemään, mikä stimuloi edelleen lisäkilpirauhasta tuottamaan lisäkilpirauhashormonia, parathormonia (PTH). Tämä taas aiheuttaa rauhasen kasvun. Sairauden edetessä lisäkilpirauhaset eivät enää reagoi normaalisti kalsiumiin ja D-vitamiiniin. Sekundäärisen hyperparatyroosin alkuvaiheessa veren kalsiumpitoisuudet ovat joko normaalit tai matalat, mutta PTH-pitoisuus on korkea. Kun sairaus pahenee, munuaisten hoitoon aloitetut hoitotoimenpiteet voivat johtaa epänormaalin korkeaan kalsiumpitoisuuteen. Korkeat PTH-pitoisuudet aiheuttavat mm. anemiaa ja luiden heikkenemistä. Näistä syistä johtuen kaikkien bisfosfonaattihoidon aloittavien potilaiden riittävä kalsiumin ja D-vitamiinin saanti tulisi turvata.

Suun kautta otettaviin bisfosfonaatteihin liittyy myös suurentunut riski sairastua ruokatorven syöpään.¹⁸ Alendronaatin hyväksymisestä vuodesta 1995 vuoteen 2008 FDA vastaanotti USA:ssa 23 raporttia, joissa todettiin potilaiden sairastuneen

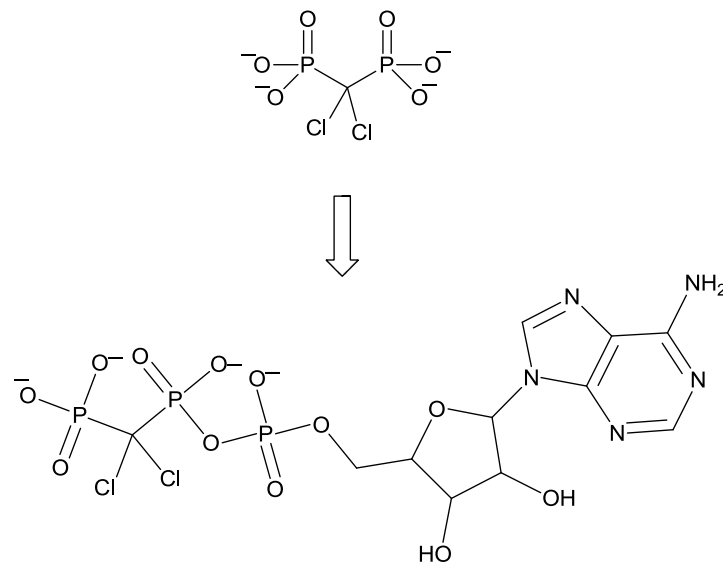
ruokatorven syöpään. Heidän tapauksissaan lääkkeiden käytön alkamisen ja syövän toteamisen välillä oleva mediaaniaika oli 2,1 vuotta. Euroopassa ja Aasiassa tapauksia oli yhteensä 31 ja mediaaniaika toteamiselle 1,3 vuotta. Suurella osalla tapauksista oli jo todettu Barretin ruokatorvioireyhtymä, joka on refluksitautia sairastaville kehittyvä tila. Sen tiedetään olevan ruokatorven syövän riskitekijä.

Myös leuan luukuolio raportoitiin yhdeksi vakavista, mutta erittäin harvinaisista haittavaikutuksista vuonna 2003. Sitä havaitaan yleensä potilailla, joita on hoidettu antamalla bisfosfonaattilääkitys suonensisäisesti suurina määrinä. Bisfosfonaatteja käyttävien potilaiden tulee käydä säännöllisesti hammastarkastuksissa, koska osteonekroosia voidaan estää hoitamalla mahdolliset hammastulehdukset välittömästi.^{18,}

33, 35

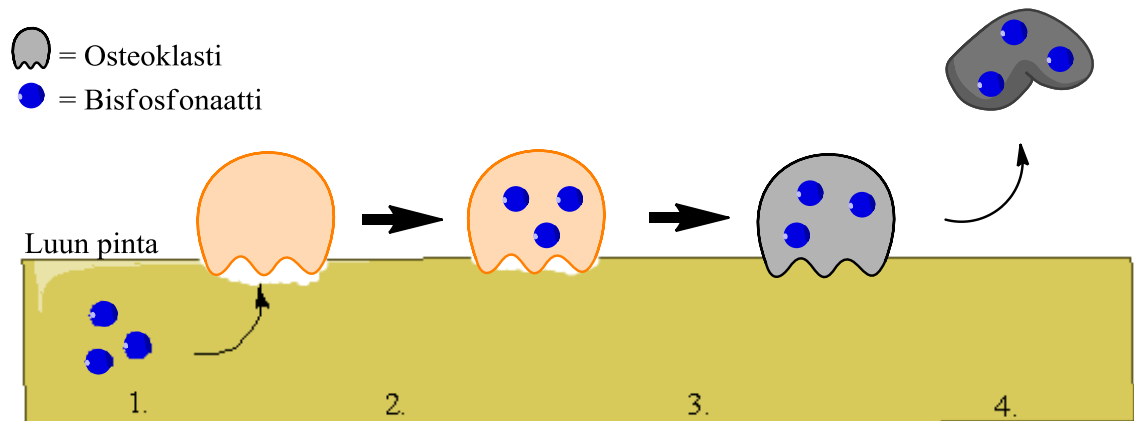
5 Ei-typpeä sisältävät bisfosfonaatit ja niiden vaikutusmekanismi

Ei-typpeä sisältävät bisfosfonaatit luokitellaan ensimmäisen sukupolven bisfosfonaateiksi. Luun hajoituksen aikana osteoklastien alla oleva solunsisäinen tila happamoituu osteoklastien vakuolityyppisten protonipumppujen toimesta. Protonipumput sijaitsevat osteoklastien solukalvon ryppyisellä puolella. pH:n ollessa hapan, hydroksiapatiittia liukenee luusta ja se lisää bisfosfonaattien liukenemistä hydroksiapatiitista samalla, kun proteolyttiset entsyymit hajottavat solun ulkopuolista luumateriaalia. Ei-typpeä sisältävät bisfosfonaatit endosytoituvat osteoklasteihin, luultavasti kalsiumin ja luun orgaanisen matriisin proteiinien kanssa kompleksina ja metaboloituvat sytotoksisiksi ATP-analogeiksi (Kuva 6).^{4, 36}



Kuva 6. Klodronaatin metaboloituminen ATP-analogiksi.

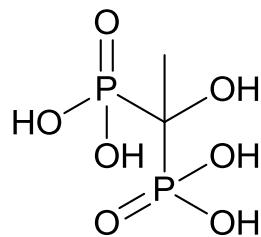
Analogit häiritsevät mitokondrioiden ADP/ATP-translokaasia, mikä estää osteoklastien toimintoja ja johtaa apoptoosiin (Kuva 7).^{2, 37-39}



Kuva 7 . 1. Bisfosfonaatit kiinnittyneinä luuhun. 2. Bisfosfonaatit siirtyvät endosytoosin kautta osteoklastin sisälle resorptioin aikana. 3. Osteoklastin resorptiivinen toiminta lakkaa. 4. Osteoklastin apoptoosi.

5.1 Ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatit

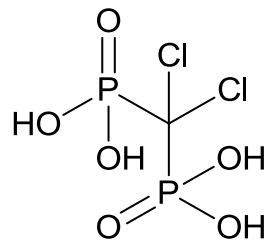
5.1.1 1-Hydroksietylideenibisfosfonaatti



Kuva 8. Etidronihappo.

Ensimmäinen lääkekäytössä ollut bisfosfonaatti oli etidronaatti (Kuva 8), jota käytettiin lapsen lihaksen kalkkeutumien hoitoon. Se on lääkeainekäytössä dinatriumsuolanaan. Sen biosaatavuus on 3-7 %. Jatkuvasti käytettynä etidronaatti heikentää kuitenkin uuden luun mineralisoitumista. Hoidon jaksottaminen kahden viikon kuureiksi kolmen kuukauden välein on osoittautunut tehokkaaksi.^{3,4}

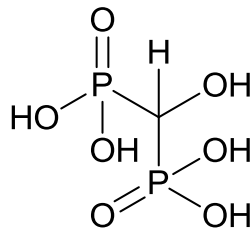
5.1.2 Dikloorimetyylibisfosfonaatti



Kuva 9. Klodronihappo.

Klodronaatin (Kuva 9) biosaatavuus on 1-2 %. Klodronaattia käytetään osteoporoosin hoidossa sekä suun kautta otettuna että suonensisäisesti. Suonensisäisesti sitä käytetään jaksottaisesti annosteltuna kolmen viikon välein, suun kautta otettuna joko jaksollisesti 25 päivän ajan joka kolmas kuukausi tai päivittäin. Kaikkien kolmen annostelutavan on todettu kasvattavan luun tiheyttä merkittävästi. Klodronaatin on todettu olevan suhteellisen turvallinen, koska sillä ei ole todistettu olevan sivuvaikutuksia.^{4, 40, 41}

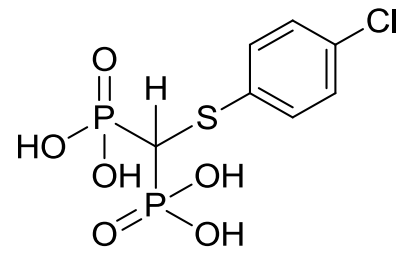
5.1.3 Hydroksimetyleenibisfosfonaatti



Kuva 10. Oksidronihappo.

Oksidronaatissa eli hydroksimetyleenibisfosfonaatissa (Kuva 10) toinen hiilessä kiinni oleva ryhmä on hydroksyyli-ryhmä ja toinen on vetyatomi. Sitä käytetään luunkuvantamisessa yhdessä teknetiumin kanssa. Sitä voidaan antaa myös suonensisäisesti.⁴²

5.1.4 4-Kloorifenyylitiometyylibisfosfaatti

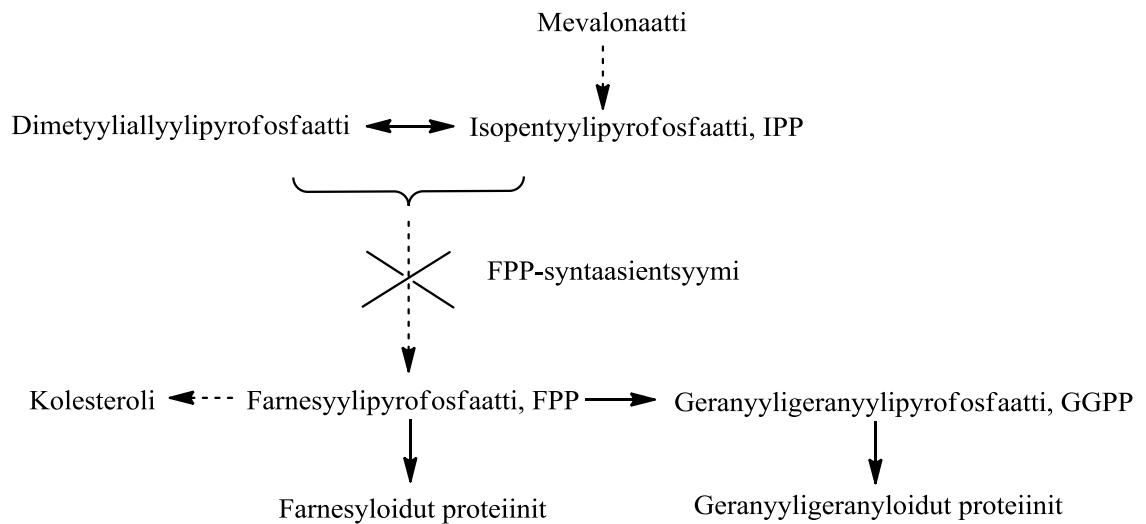


Kuva 11. Tiludronihappo.

Tiludronaatin (Kuva 11) biosaatavuus on 6 %. Tiludronaattia käytetään Pagetin taudin hoidossa.^{2,4}

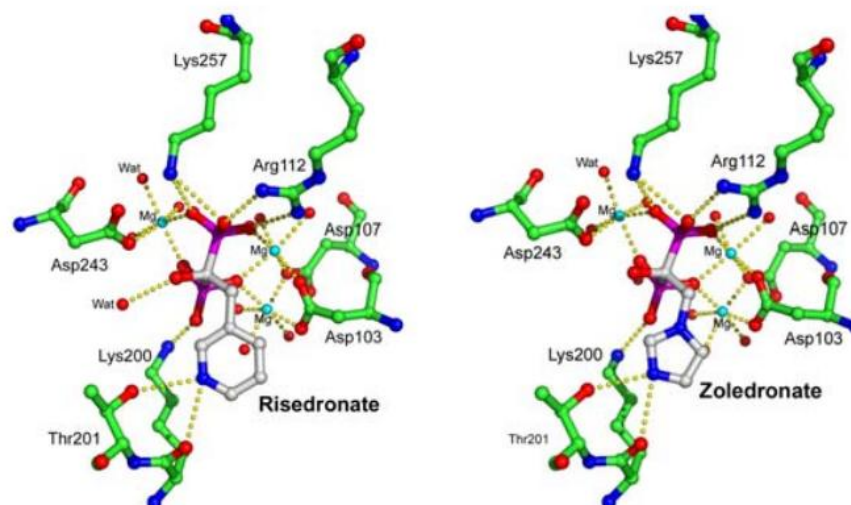
6 Typeä sisältävät bisfosfonaatit ja niiden vaikutusmekanismi

Typeä sisältävien bisfosfonaattien biosaatavuus on yleisesti alle 1 %. Typeä sisältävien bisfosfonaattien spesifinen farmakologia johtuu niiden kalsiumin adsorptiosta ja kelatoivista ominaisuuksista. Nämä bisfosfonaatit toimivat farmakologisesti inhiboimalla farnesyylipyrofosfaattisyntaasientsyymiä. FPPS on vastuussa mevalonihapon metaboliasta. (Kuva 12).



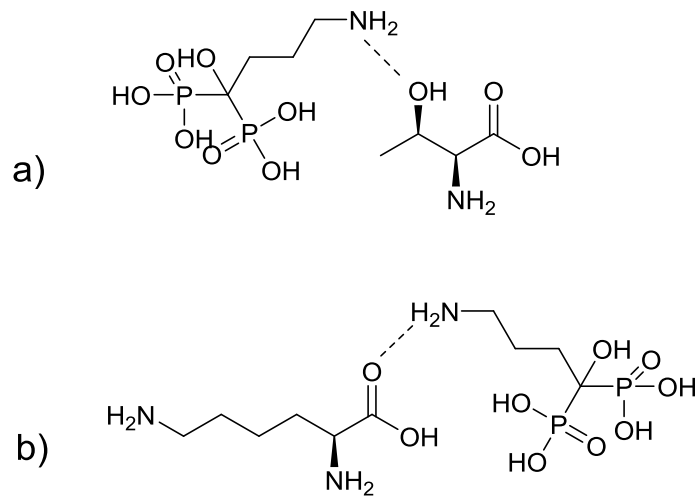
Kuva 12. FPPS:n inhibointi.

Kaikki bisfosfonaatit sitoutuvat FPPS-entsyymiin bisfosfonaatin fosfonaattiosalla, joka sitouu FPPS-entsyymiin asparagiinirikkaaseen osaan magnesiumionin kautta (Kuva 13).



Kuva 13. Risedronaatin ja tsoledronaatin sitoutuminen FPPS-entsyymiin³⁹.

Tehokkaimmat tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit muodostavat vetysidoksia bisfosfonaatin tyyppiä treoniinin hydroksyyliin ja lysiinin karbonyyliin (Kuva 14).³⁹



Kuva 14. Alendronaatin vetysitoutuminen a) treoniiniin b) lysiiniin.

Mevalonaattireitin pääasiallinen tarkoitus on kolesterolin tuottaminen. Ensimmäiset vihjeet tästä inhiboivasta vaikutustavasta saatiin vuonna 1992, kun Aminin työryhmä selvitti kolesterolin biosynteesin inhiboijia. He huomasivat, että aminobisfosfonaateista ibandronaatti ja inkadronaatti inhiboivat skvaleenin ja mahdollisesti muidenkin mevalonihapon synteesiin liittyvien entsyymien synteesiä. FPPS:n inhibointi johtaa isoprenoidilipidien, kuten farnesyylipyrofosfaatin ja geranyyligeranyylipyrofosfaatin vähentyneeseen tuotantoon, proteiiniprenylaation pienenemiseen sekä isopentenyylipyrofosfaatin (IPP) kertymiseen. Useiden GTPaasien tulee prenyloitua, jotta ne voivat hakeutua kohti solukalvoa ja aktivoitua. GTPaasien aktiivisuutta inhiboimalla ja prenyloitumista estämällä bisfosfonaatit häiritsevät solun toimintoihin, kuten migraatioon ja profilaatioon erikoistuneita solunsisäisiä prosesseja ja estävät näin osteoklasteja selviytymästä. IPP:n kumuloituminen aktivoi γ, δ -T-soluja ja laukaisee akuutin faasin reaktion. T-soluja on runsaimmin ruoansulatuskanavan limakalvoilla. Bisfosfonaatit vaikuttavat pääasiassa osteoklasteihin, mutta tuoreimmat tutkimukset ovat osoittaneet niiden vaikuttavan myös muihin solutyyppeihin, kuten osteoblasteihin, osteosyytteihin tai T-lymfosyytteihin.⁴³⁻⁴⁸

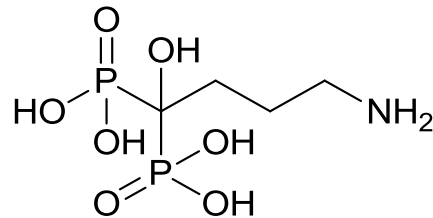
Tyyppiä sisältävillä bisfosfonaateilla on myös toinen vaikutusmekanismi. FPPS:n inhiboituessa ja IPP:n kumuloituessa IPP:stä muodostuu aminoasyyli-tRNA-syntetaasientsyymien avulla ApppI-molekyyliä. Tämä on ATP-analogi, mutta ei

kuitenkaan metaboliitti, sillä sen rakenteessa ei ole bisfosfonaattia. ATP-analogit indusoivat osteoklastien apoptoosia. AppI:n uskotaan muodostuvan adenosiinimonofosfaatin ja IPP:n kondensoituessa.^{36, 39, 49}

6.1 Toisen sukupolven bisfosfonaatit

Toisen sukupolven bisfosfonaateiksi luetaan ne tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit, jotka eivät sisällä tyyppiä sisältävää heterorengasta rakenteessaan.

6.1.1 (4-Amino-1-hydroksibutylideeni)bisfosfonaatti

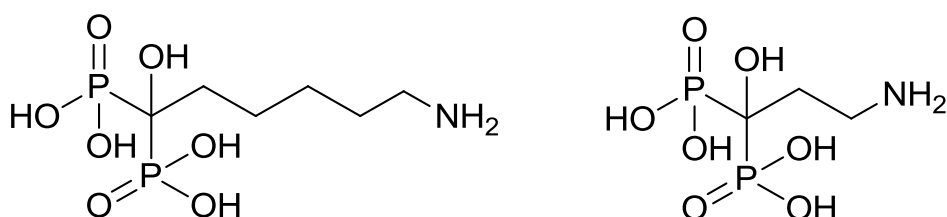


Kuva 15. Alendronihappo.

Lääkeaineena alendronaatti (Kuva 15) on natriumsuolamuodossa. Se on yhdessä pamidronaatin kanssa aktiivisimpia kliinisessä käytössä olevia lääkeaineita. Sen biosaatavuus suun kautta on vain 0,75 %.^{2, 17, 41, 42}

Alendronaatti oli vuonna 1999 Yhdysvalloissa ainoa FDA:n hyväksymä bisfosfonaatti osteoporoosin hoitoon.⁴ Sen päivittäinen annostus oli 5 mg luukadon estämiseksi menopausaalisilla naisilla ja 10 mg jo edenneen osteoporoosin hoitoon. Yhden kolmivuotisen tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää murtumien riskiä alendronaattia käytettäessä. Tutkimukseen osallistui yli 2000 naista, mutta koe keskeytettiin hyvin aikaisessa vaiheessa, koska tulokset olivat jo siinä vaiheessa merkittävät - riski murtumille oli pudonnut puoleen. Alendronaattia ei tulisi antaa potilaille, jotka eivät pysty annoksen ottamisen aikana olemaan pystysuorassa asennossa tai joilla on ylemmän ruoansulatuskanavan tai ruokatorven oireita. 10 % lääkityksen aloittajista ei pysty jatkamaan lääkitystä.

6.1.2 (6-Amino-1-hydroksiheksylideeni)bisfosfonaatti ja (3-amino-1-hydroksipropylideeni)bisfosfonaatti

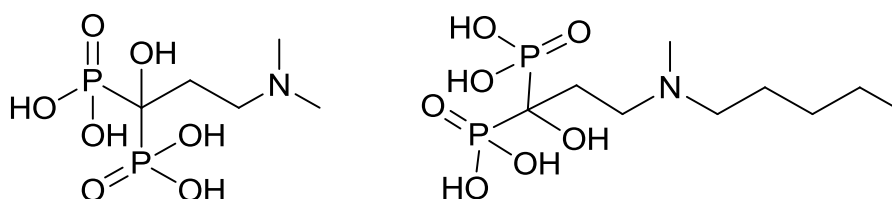


Kuva 16. Neridroni- ja pamidronihappo.

Lääkeaineena neridronaatti (Kuva 16) on mononatriumsuolamuodossa. Neridronaatin on huomattu tehoavan myös CRPS-oireiden, eli monimuotoisen alueellisen kipuoireyhtymän hoitoon. Neridronaatti oli testilääkekäytössä CRPS-tyypin I hoitoon ja vuoden käytön jälkeen potilaiden oireet olivat hävinneet.^{42, 50, 51}

Pamidronaatin (Kuva 16) lääkeaine on dinatriumsuolamuodossa. Pamidronaatin biosaatavuus on vain 0,3-0,48 %. Pamidronaattia on käytetty mm. pahanlaatuisen hyperkalsemian ja Pagetin taudin hoitoon. Suun kautta otettavaa lääkettä otetaan joko 150 mg:n tai 300 mg:n annoksina. Päivittäisen annostelun on todettu kasvattavan luutiheyttä selkärangassa. Suun kautta annettuna pamidronaatti aiheutti kuitenkin sivuvaikutuksia ruokatorvessa, minkä vuoksi sitä siirryttiin antamaan suonensisäisesti niille osteoporoosipotilaille, jotka eivät pystyneet käyttämään lääkettä suun kautta. 30 mg:n annoksen annostelu tapahtuu 1-2 tunnin aikana joka kolmas kuukausi. Sekä suun kautta nautittavan, että suonensisäisesti annettavan pamidronaatin on todettu auttavan kortikosteroidin aiheuttaman osteoporoosin hoidossa.^{4, 42, 52}

6.1.3 (3,3-Dimetyyliamino-1-hydroksipropylideeni)bisfosfonaatti ja [1-hydroksi-3-(metyylipentyyliamino)propylideeni]bisfosfonaatti

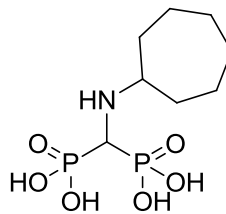


Kuva 17. Olpadroni- ja ibandronihappo.

Lääkeaineena olpadronaatti (Kuva 17) on dinatriumsuolamuodossa. Olpadronaatin biosaatavuus on 2-4 %. Suun kautta nautittuna olpadronaattia siedetään yleensä 5-10 kertaa suurempina annoksina kuin alendronaattia. Olpadronaatin työssä kiinni olevat kaksi metyyliiryhmää saavat sen vesiliukoisuuden kahdeksankertaiseksi alendronaattiin ja pamidronaattiin verrattuna. Olpadronaatin rakenteessa ei myöskään ole terminaalista aminoryhmää, minkä vuoksi sillä ei ole ruokatorveen ja ruoansulatuskanavaan kohdistuvia sivuvaikutuksia.^{42, 53}

Ibandronaattia (Kuva 17) käytetään sen natriummonohydraattimuodossa. Ibandronaattia käytetään post-menopausaalisten naisten osteoporoosin ehkäisyyn. Ibandronaattia voidaan käyttää suun kautta otettavana lääkkeenä, jolloin se imeytyy nopeasti, tai suonensisäisesti. Ibandronaatin biosaatavuus suun kautta on 0,63 %.^{42, 54}

6.1.4 (Sykloheptyyliamino)metyylibisfosfonaatti



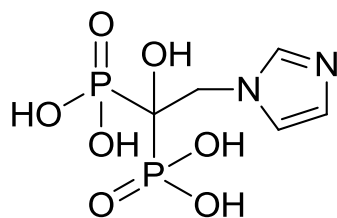
Kuva 18. Inkadronihappo.

Lääkeaineena inkadronaatti (Kuva 18) on dinatriumsuolamuodossa. Inkadronaatti on 240 kertaa tehokkaampi kuin etidronaatti ja neljä kertaa tehokkaampi kuin alendronaatti, mutta vain kymmenes- tai sadasosan siitä, mitä kolmannen sukupolven bisfosfonaatit tsoledronaatti ja risedronaatti. Inkadronaattilla on sytotoksisia vaikutuksia osteoklasteihin, joten sitä ei pidetä turvallisena lääkekäytössä.^{42, 55-57}

6.2 Kolmannen sukupolven bisfosfonaatit

Kolmannen sukupolven bisfosfonaateiksi luetaan ne tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit, joissa on tyyppiä sisältävä heterorengas.

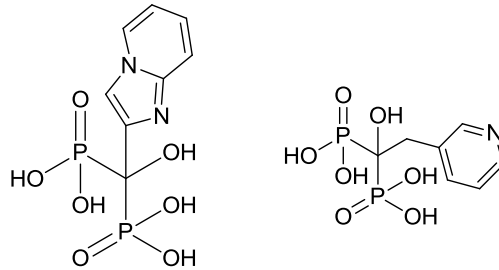
6.2.1 [1-Hydroksi-2-(imidats-1-yyli)etylideeni]bisfosfonaatti



Kuva 19. Tsoledronihappo.

Tsoledronaattia (Kuva 19) käytetään lääkeaineena monohydraattimuodossa. Tsoledronaatti oli Suomessa hammaslääkäreiden vuonna 2013 haittavaikutuksista eniten raportoima bisfosfonaatti. Tsoledronaattia käytetään hyperkalsemian hoidossa ja syövän kemoterapiassa luuvaurioiden hoitoon. Sitä pidetään bisfosfonaateista käyttökelpoisimpana, koska sen pitoisuus on maksimissaan heti tiputuksen jälkeen. Tablettimuodossa vastaavaan pitoisuuteen päästään vasta useamman kuukauden lääkinnän jälkeen. Tsoledronaatti hidastaa luun hajoamista ja laskee luista vereen vapautuvan kalsiumin määrää. Suun kautta sen biosaatavuus on <1 %, kun suonensisäisesti se voi olla jopa 100 %.^{19, 42, 58-61}

6.2.2 [1-Hydroksi-2-imidatso(1,2a)-pyridin-3-yylietylideeni]-bisfosfonaatti ja [1-hydroksi-2-(3-pyridinyyli)etylideeni]-bisfosfonaatti



Kuva 20. Minodroni- ja risedronihappo.

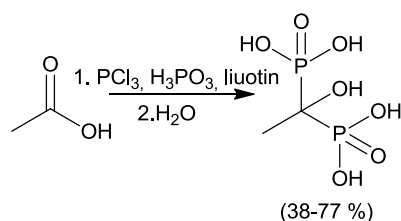
Lääkeaineena minodronaatti (Kuva 20) on käytössä monohydraattimuodossa. Sillä on vastaavat tai suuremmat luun antiresorptiiviset vaikutukset kuin tsoledronaatilla, mutta myös vastaavat tai suuremmat tulehdusta ja nekroosia aiheuttavat sivuvaikutukset. Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että kun tyyppiä sisältäviä bisfosfonaatteja käytetään hoidossa yhdessä ei-tyyppiä sisältävien bisfosfonaattien kanssa, ne voivat pienentää tai estää tulehduksellisia sivuvaikutuksia. Minodronaatilla on myös kipua lievittäviä ominaisuuksia.^{62, 63}

Risedronaatin (Kuva 20) biosaataavuus on 0,65 %. Risedronaatti vaikuttaa kasvattamalla osteoklastien solukuolemien määrää. Risedronaattihoidolla voidaan vähentää murtumien riskiä osteoporoosia sairastavilla. Sitä käytetään myös Pagetin taudin hoidossa.^{64, 65}

7 Bisfosfonaattien valmistus

7.1 Bisfosfonihappojen valmistus karboksyyli- ja aminohapoista

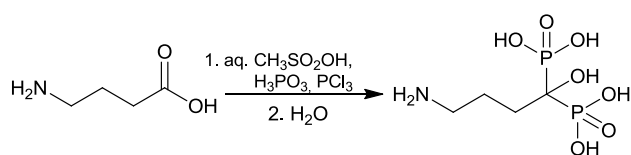
1-Hydroksibisfosfonihappojen valmistuksessa on kaksi pääasiallista synteesireittiä. Ensimmäinen, suora synteesireitti perustuu kondensaatioreaktioon, jossa karboksyylihappo reagoi fosforihapon ja fosforitrikloridin, fosforipentakloridin tai fosforioksidikloridin seoksen kanssa. Tämän jälkeen seuraa hydrolyysi joko vedellä tai suolahapolla (Kuva 21).^{66, 67}



Kuva 21. 1-Hydroksietylideenibisfosfonaatin synteesi etikkahaposta.

Nämä fosfonihapot valmistetaan erilaisissa liuottimissa, kuten klooribentseenissä, sulfolaanissa, ioniliuoksissa tai difenyylieetterissä. Näissä liuottimissa seokseen muodostuu kuitenkin sakkaa, eikä se sekoitu tasaisesti. Nämä liuottimet toimivat laboratoriotasolla, mutteivät suurissa mittakaavoissa, minkä vuoksi niiden sijaan käytetään metaanisulfonihappoa. Metaanisulfonihappoa käytettäessä vältetään saostuminen, mutta saantoprosentit jäävät alhaisiksi. Metaanisulfonihapon määrä tuleekin pitää pienenä, jotta reaktio ei etenisi liian nopeasti. Reaktioseos pysyy nestemäisenä konsentraation ollessa 2,5 M. Tämä mahdollistaa myös karboksyylihapon täydellisen konversion bisfosfonaatiksi. Adiabaattisissa olosuhteissa tämä reaktio muuttuu itsestään lämpiäväksi +85 °C:n lämpötilassa ja kontrolloimattomaksi >+140 °C:ssa. Reaktio etenee kuitenkin loppuun +55 °C:ssa kolmessa päivässä ja +65 °C:n lämpötilassa yön yli refluksottaessa.^{66, 68}

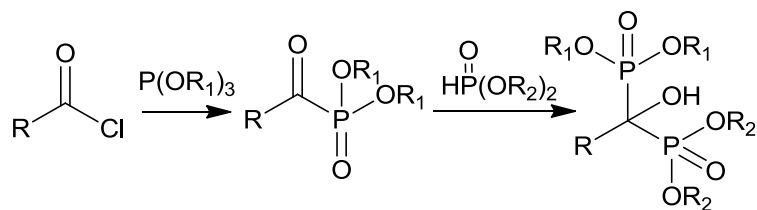
Amino-1-hydroksibisfosfonihappoja voidaan valmistaa samalla menetelmällä käyttäen lähtöaineena haluttua aminohappoa (Kuva 22).⁶⁸



Kuva 22. (4-Amino-1-hydroksibutylyideeni)bisfosfonaatin synteesi 4-aminovoihaposta.

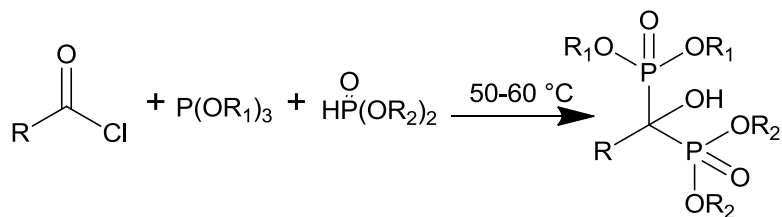
Aminohappo, fosforihappo ja metaanisulfonihappo laitetaan kolviin ja reaktioseosta kuumennetaan typpi-ilmakehässä +65 °C:seen. Sen jälkeen seokseen lisätään fosforitrikloridi 20 minuutin aikana ja seoksen annetaan sekoittua 16-20 h. Väritön liuos jäädytetään +25 °C:seen ja reaktio sammutetaan 0-5 °C:lla vedellä voimakkaasti sekoittaen. Kolvi huuhdotaan vielä vedellä ja yhdistettyjä seoksia refluksoidaan viisi tuntia. Seoksen annetaan jäähtyä +20 °C:seen minkä jälkeen sen pH säädetään arvoon 1,8 50 % NaOH-liuoksella. Seosta sekoitetaan 0-5 °C:ssa vielä kaksi tuntia. Tuote kiteytyy suoraan jäähtyessään ja se otetaan talteen suodattamalla seos. Sakkaa pestään vedellä ja etanolilla, minkä jälkeen se kuivataan.⁶⁸

Toisessa, epäsuorassa synteesireitissä Michaelis-Arbuzovin reaktio saa aluksi aikaan α -ketofosfonaatin happohalidista (esim. happokloridi) ja trialkyylifosfiitista (Kuva 23).⁶⁷ Toisessa vaiheessa dialkyylifosfiitti liitetään juuri aikaansaatuun α -ketofosfonaattiin ja saadaan aikaan 1-hydroksi-1,1-bisfosfonaatti.



Kuva 23. 1-Hydroksialkyylibisfosfonaatin valmistus happokloridista.

Yllä oleva reaktiotuote voidaan valmistaa myös yhden vaiheen reaktiolla (Kuva 24). Asyylihalidi lisätään di- ja trialkyylifosfiittien seokseen +50-60 °C:ssa. Tällä vältetään välituotteen muodostuminen saannon ollessa silti hyvä.⁶⁷

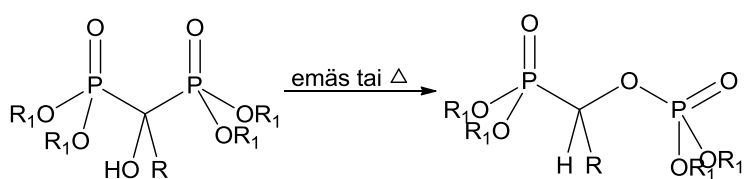


Kuva 24. 1-Hydroksialkyylibisfosfonaatin vaihtoehtoinen reitti happokloridista.

Michaelis-Arbuzovin reaktion ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu S_N2 -reaktio, jossa fosforin vapaa elektronipari hyökkää alkyylihalidin elektrofiiliseen hiileen muodostaen fosfoniumioni-välituotteen. Syrjäytetty halidianioni hyökkää fosfoniumioniin, jolloin syntyy haluttu fosfonaatti ja toinen alkyylihalidi. Syntyneet esterit muokataan

happomuotoon joko refluksimalla reaktioseosta vähintään 6 M suolahapon kanssa tai käsittelemällä sitä trimetyylisilylibromidilla tai -jodidilla. Tämän jälkeen reaktiotuote on helposti hydrolysoitavissa metanolilla happomuotoon.^{67, 69}

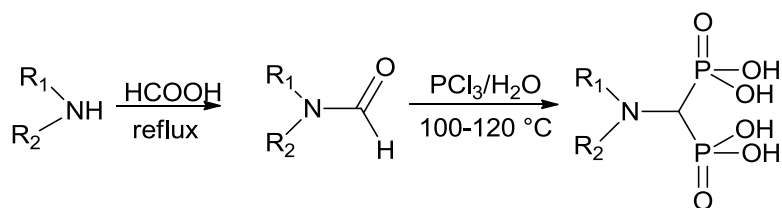
Vaikka 1-hydroksi-1,1-bisfosfonihapot ovat melko pysyviä yhdisteitä, 1-hydroksi-1,1-bisfosfonihappojen esterit, esim. alendronaatin esterit, eivät niinkään. NMR-tutkimusten perusteella on todettu, että käsiteltäessä yhdisteitä emäksellä tai kuumentamalla niitä, ne uudelleenjärjestäytyvät alla olevan kuvan mukaisesti (Kuva 25). R-ryhmän ollessa alkyyliryhmä (esim. etidronaatti) uudelleenjärjestäytyminen tapahtuu ilman emäksen lisäystäkin, jos lämpötila kohoaa +120 °C:seen.



Kuva 25. Bisfosfonaatin uudelleenjärjestäytyminen emäksen tai lämmön vaikutuksesta.

7.2 Bisfosfonihappojen valmistus amiineista ja amideista

Bisfosfonihappoja valmistetaan yksinkertaisella synteisillä amiineista formyloimalla ne ensin muurahaishapolla, jolloin saadaan välituotteeksi formamidi.⁷⁰ Formamidi eristetään ja se reagoi suoraan veden ja fosforitrikloridin kanssa muodostaen aminometyleenibisfosfonihapon (Kuva 26).



Kuva 26. Aminometyleenibisfosfonihapon valmistus amiinista.

Reaktiot tapahtuvat helpommin primäärisillä kuin sekundäärisillä amiineilla.⁷⁰ Diisopropyyliamiinilla taas reaktiota ei tapahdu lainkaan suuren steerisen esteen takia.

100 ml:n kolviin laitetaan 5 mmol amiinia ja 19,5 mmol vedetöntä muurahaishappoa.⁷⁰ Reaktioseosta refluksoidaan viisi tuntia. Muodostunut vesi ja muurahaishappoylimäärä

poistetaan tislaamalla reaktioseosta koko refluksionnin ajan. Kolviin muodostuu reaktion välituote, formamidi. Reaktioseos jäädytetään huoneenlämpöön, minkä jälkeen siihen lisätään 34 mmol vettä. 31 mmol fosforitrikloridia lisätään reaktioseokseen hitaasti tiputtamalla, samalla kun reaktioseosta sekoitetaan jäähauteessa. Tippoja lisätään niin hitaasti, ettei seoksen lämpötila nouse yli +25 °C:n. Lisäyksen jälkeen reaktioseos lämmitetään +100-120 °C:seen, jossa sen annetaan olla puoli tuntia, kunnes havaitaan saostumista. Reaktio sammutetaan 30 ml:lla vettä ja hydrolysoidaan refluksioimalla sitä tunti. Aminobisfosfonihappo kiteytyy suoraan reaktioseoksen vesiliuoksesta, kun se on jäähtynyt huoneenlämpöön. Lisätään etanolia ja pH säädetään arvoon 1-2. Natriumbisfosfonaatti saadaan jäädytyksen jälkeen säätämällä pH arvoon 7-8 20 % NaOH-liuoksella.

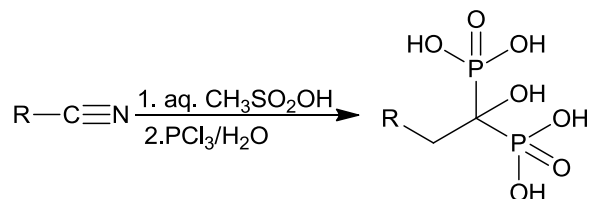
Aminometyleenibisfosfonaatteja voidaan valmistaa amiineista myös trietyyliortoformiaatin ja dietyylifosfiitin tai etyylietyalkyylifosfinaatin (tai trietyylifosfiitin) avulla. Synteisiin voidaan käyttää primäärisiä ja sekundäärisiä amiineja melko laajalla skaalalla. Tämä kolmen komponentin menetelmä on melko monimutkainen ja etenee monien välituotteiden, kuten imiinien ja aminofosfonaattien kineettisten ja termodynaamisten tasapainojen kautta.^{71, 72}

Alkyyliasetamideista voidaan valmistaa fosforihapon ja fosforitrikloridin avulla bisfosfonaatteja kuten kappaleen 7.1 esimerkeissä.⁷³ Tällöin lämpötilalla on suuri vaikutus. Kun reaktioseosta lämmitetään +80-85 °C:ssa 3-4 tuntia, saadaan bisfosfonihappo. Jos reaktioseosta puolestaan lämmitetään +85-95 °C:ssa 6-10 h, tuotteeksi saadaan dianhydridi, joka miedosti happamissa olosuhteissa hydrolysoituu monosykliseen muotoon.

7.3 Bisfosfonihappojen valmistus alkyyneistä ja nitrileistä

Kun bisfosfonihappojen synteisiin haluttiin kehittää menetelmä, joka olisi tehokas ja edullinen, syntyi synteesi (Kuva 27), jossa bisfosfonihapot valmistetaan nitrileistä ja saannot vaihtelevat välillä 64-79 %. Prosessissa käytetään metaanisulfonihapon vesiliuosta, jonka avulla bisfosfonaatteja voidaan valmistaa suuremmalla skaalalla. Uusi menetelmä on edullisempi kuin esim. kappaleen 7.1 menetelmä ja reagenssit ovat helposti saatavilla. Koko prosessi voidaan suorittaa yhdessä liuottimessa. Reaktiossa on

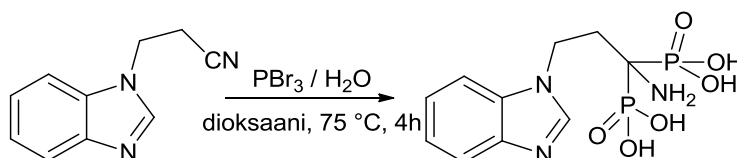
kuitenkin turvallisuusriski, koska se voi muuttua kontrolloimattomaksi lämpötilan ylittäessä +85 °C.^{66, 69}



Kuva 27. Bisfosfonihappojen valmistus nitrileistä.

Metaanisulfonihappo lisätään haluttua bisfosfonihappoa vastaavan nitriliin sekaan ja seosta lämmitetään +98-100 °C:ssa 8 tuntia. Reaktioseos jäädytetään +65 °C:seen, minkä jälkeen reaktioseokseen lisätään fosforitrikloridia 25 min ajan. Reaktioseosta sekoitetaan +65-70 °C:ssa 5 tuntia, minkä jälkeen se jäädytetään +30 °C:seen ja seoksen sekaan lisätään erittäin hitaasti jäädytettyä vettä 30 min ajan. Reaktioseos lämmitetään +98 °C:seen ja 15 tunnin sekoituksen jälkeen jäädytetään +50 °C:seen. Lisätään metanolia ja sekoitetaan +5-10 °C:ssa kaksi tuntia, minkä jälkeen sakka suodatetaan ja kuivataan. Natriumbisfosfonaatit valmistetaan kuten edellä, mutta ennen metanolilisäystä reaktioseoksen pH säädetään arvoon 4,3 30% NaOH-liuoksella.

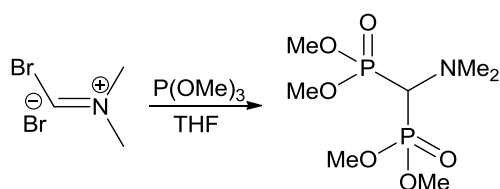
Myös substituoiduista nitrileistä voidaan valmistaa bisfosfonaatteja. Tästä esimerkkinä esitetään bentsimidatsoyylisubstituoidun bisfosfonihapon valmistus (Kuva 28).⁷⁴



Kuva 28. Bentsimidatsoyylibisfosfonihapon valmistus substituoidusta nitrilistä.

7.4 Bisfosfonihappojen valmistus imiineistä ja imiinien kaltaisista yhdisteistä

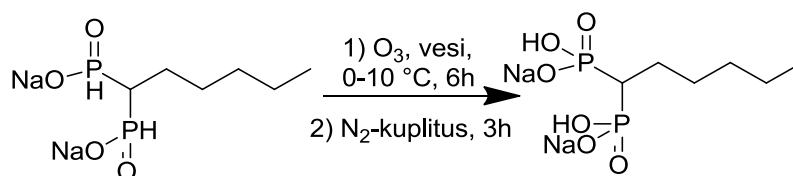
Etoksimetyyleeni-imiinejä voidaan käyttää *N*-substituoitujen aminobisfosfonaattien valmistuksessa. Myös (bromimetyyleeni)dimetyyli-iminiumbromidisuolan ja 2 eq. trimetyylifosfiitin välisessä reaktiossa saadaan aikaan 1,1-bisfosfonaatin metyyliesterijohdannainen (Kuva 29).^{71, 75}



Kuva 29. Aminobisfosfonaatin valmistus imiinistä.

7.5 Bisfosfonaattien valmistus bisfosfinaateista hapettamalla

Bisfosfonaatteja voidaan valmistaa myös hapettamalla vastaavaa bisfosfinaattia esimerkiksi otsonolyysin avulla (Kuva 30).⁷⁶

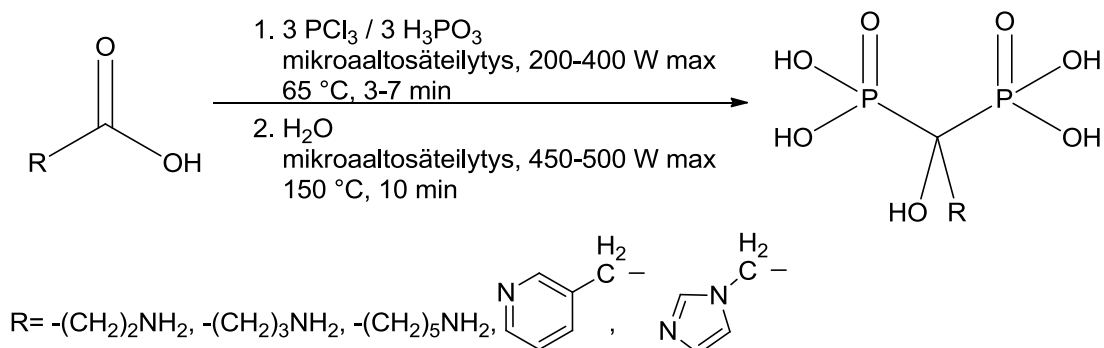


Kuva 30. Alkyylibisfosfonaatin valmistus otsonolyysin avulla.

Myös muita reagensseja kuin otsonia, kuten esim. H_2O_2 , NaOCl tai Br_2 on käytetty bisfosfinaattien hapettamiseen. Otsonolyysin on kuitenkin todettu olevan sopivin menetelmä.

7.6 Bisfosfonaattien valmistus mikroaaltojen avulla

Typeä sisältäviä heterosykli- ja alkyylibisfosfonaatteja voidaan valmistaa nopeasti mikroaaltojen avulla (Kuva 31).⁷⁷



Kuva 31. 1-Hydroksibisfosfonihapon valmistus mikroaaltojen avulla.

Saannot ovat hyviä vain 20 minuutin reaktioajan jälkeen, kun perinteisillä menetelmillä bisfosfonaattien valmistamiseen kuluu päivä tai useita päiviä.⁷⁷ Mikroaalloista on suuri apu bisfosfonaattien valmistuksessa, kun reaktioaika saadaan lyhyemmäksi, mutta samalla voidaan kontrolloida myös lämpötiloja ja mahdollisia sivutuotteita. Liuottimeksi reaktioihin sopii parhaiten sulfolaani, jonka korkea polariteetti parantaa mikroaaltojen tehokkuutta. Lisäksi se on neutraali ja veteen sekoittuva, minkä vuoksi sitä ei tarvitse erikseen poistaa ennen hydrolyysiä. Se on myös myrkytön ja ympäristöystävällisempi kuin muut usein käytetyt orgaaniset liuottimet. Sulfolaanin kiehumispiste on korkea (+285 °C), mikä mahdollistaa korkeiden reaktiolämpötilojen käytön. Muita mikroaaltosyntetiikassa käytettyjä liuottimia ovat olleet klooribentseeni, metaanisulfonihappo, ioniliuokset, difenyylietteri ja fenoli.

Mikroaaltosynteesiä voidaan käyttää myös ilman liuotinta. Dialkyyli- α -oksofosfonaatti ja dialkyylifosfiitti reagoivat mikroaaltojen ja dietyyliamiinikatalyytin avulla +120 °C:ssa 20 minuutissa muodostaen hydroksibisfosfonaatin hyvällä 81-85 %:n saannolla.^{78, 79}

8 Bisfosfonaattien aihiolääkkeet

Aihiolääkkeet ovat sellaisia lääkeaineiden ei-aktiivisia esimuotoja, jotka muuttuvat elimistössä joko kemiallisen tai entsyymattisen hajoamisen kautta vaikuttavaksi aineeksi. Molekyylejä, joissa on kaksi toinen toisensa jälkeen hydrolysoituvaa aihiosaa, kutsutaan kaksinkertaisiksi aihiolääkkeiksi. Ihanteellisen aihiolääkkeen ominaisuuksia ovat myrkyttömyys, riittävä vesi- ja rasvaliukoisuus, kemiallinen pysyvyys ja sopivassa kudoksessa sopivalla nopeudella tapahtuva hydrolysaatio. Bisfosfonaattiaihiolääkkeiden tavoitteena on parantaa lääkkeen biosaatavuutta ja turvallisuutta.^{41, 52, 80}

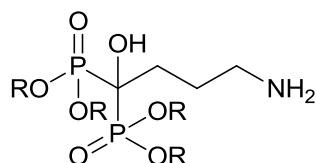
Bisfosfonaattien happoryhmiä voidaan muokata liittämällä niihin yksi tai useampi rakenne, joka parantaa lääkeaineen rasvaliukoisuutta ja jotka estävät happoryhmien ionisoitumisen peittämällä ne.⁴¹ Suosituin menetelmä on esteröinti, koska useat helposti saatavilla olevat suojausryhmät sisältävät joko hydroksyyli- tai happoryhmän. Joissain bisfosfonaateissa on hydroksyyli-ryhmä keskushiielessä kiinni, mutta sen muokkaaminen on työlästä sterisen esteen takia.

Bisfosfonaattien aihiolääkkeiksi voidaan laskea myös ne johdannaiset, jossa bisfosfonaatti on liitetty yhteen syöpää ehkäisevän lääkeaineen, kuten esim. doksorubisiinin kanssa.⁸¹ Näillä johdannaisilla voidaan varmistaa lääkeaineiden vaikutus hyödyntämällä niitä bisfosfonaattien ominaisuuksia, joilla ne hakeutuvat kohti luuta. Bisfosfonaattidokсорubisiiniaihiolääke sisältää tioliryhmän sisältävän bisfosfonaatin, jonka tiedetään reagoivan maleimidiryhmän sisältävän dokсорubisiinin kanssa.

Menopausaalisten naisten luukadon hoidossa ei voida käyttää estrogeenihoitoa sivuvaikutusten vuoksi.¹¹ Tämän vuoksi on kehitelty estrogeenijohdannaisia, joihin olisi kiinnitetty bisfosfonaatti. Vaikka useita tällaisia johdannaisia on valmistettu, ei ainuttakaan niistä ole otettu kliniseen käyttöön.

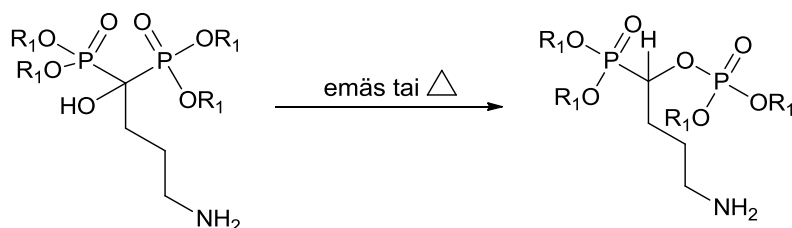
8.1 Alendronaattijohdannaiset

Alendronihaposta on pyritty valmistamaan johdannaisia esteröimällä fosfonihappoja tai muokkaamalla alendronihapon amino- tai hydroksyyliiryhmää.⁸² Tetra-alkyyli-alendronaateilla (Kuva 32) ei ole enää happamia protoneja, minkä vuoksi niiden polaarisuus on muuttunut eikä niillä ole enää kahtaisioniluonnetta.



Kuva 32. Tetra-alkyyli-alendronaatti.

Polaarisuuden muutos sekä rasvaliukoisuuden paraneminen voivat muokata alendronaatin farmakokineettistä luonnetta.⁸² Fosfaattiryhmiä ei voida suoraan esteröidä, koska pH:n ollessa yli 8 ja/tai reaktion lämpötilan ollessa yli +60 °C, molekyyli järjestäytyy nopeasti uuteen konformaatioon, kuten kappaleessa 7.2 mainittiin (Kuva 33). Esimerkiksi karbobsyylialendronihapon suoraan esteröintiin kokeiltiin useita erilaisia menetelmiä, mutta jokainen niistä epäonnistui. Alendronaatin erittäin reaktiivinen primäärinen amiini esti myös reaktiot, jotka oli suunniteltu tämän uudelleenjärjestäytymisen estämiseksi.

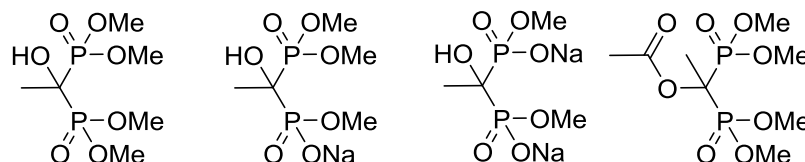


Kuva 33. Alendronaatin uudelleenjärjestäytyminen.

N-asyyli-alendronaateiksi muokkaaminen vaikuttaa myös kahtaisioniluonteeseen ja lisää alendronaatin rasvaliukoisuutta.⁸² Vachal *et al.*:n tutkimuksissa keskityttiin rasvahappokonjugaatteihin, koska yksinkertaisimmat *N*-alkyyli-alendronaatit eivät muuttaisi lääkeaineen farmakokineettistä luonnetta. Tutkimuksissa harkittiin, olisiko lipaasiin perustuva asylaatio mahdollinen *in vivo* -olosuhteissa.

8.2 Etidronaattijohdannaiset

Etidronaatti on maailman tutkituin bisfosfonatti. Sen valmistus eroaa klodronaatin valmistuksesta, sillä se uudelleenjärjestyy nopeasti (kts. Kuva 33). Turhanen *et al.*⁸³⁻⁸⁸ ovat tutkineet erilaisia etidronaattijohdannaisia. Etidronaatin ei-substituoidut alkyyliesterijohdannaiset (esim. Kuva 34) eivät ole todellisia etidronaatin aihiolääkkeitä, vaikka etidronaatin tetrametyyliesteri näyttikin hydrolysoituvan ihmisseerumissa. Myöhemmin hydrolyysituotteeksi oletetun molekyylin todettiin olevan uudelleenjärjestynyt isomeeri. Isomeroituminen voidaan välttää muokkaamalla keskushiilen alkoholiryhmää, mutta silloinkin sekä entsymaattinen että kemiallinen hydrolysoituminen on todella hidasta.⁴¹

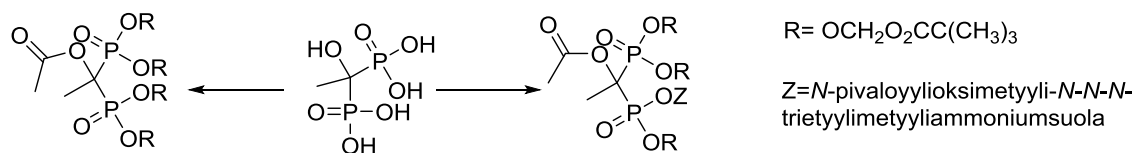


Kuva 34. Etidronaatin alkyyliesterijohdannaisia.

Etidronihapon keskushiilessä on kiinni tertiäärinen hydroksyyliiryhmä, jota on vaikea muokata steerisen esteen takia. Tätä steeristä estettä pidetään syynä siihen, miksi etidronihapon ja sen johdannaisten kemiallinen hydrolyysi on entsymaattista nopeampi.

41, 89

Etidronaattista on johdettu myös tri- ja tetrasubstituoituja pivaloyylioksimetyyliestereitä (Kuva 35).

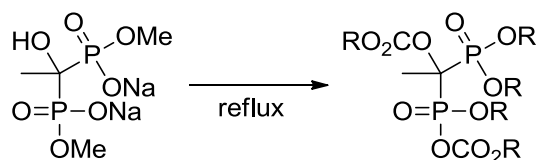


Kuva 35. Etidronaatin pivaloyylioksimetyyliesterin valmistus.

Trisubstituoidut esterit imeytyivät ihanteellisesti ruoansulatuskanavasta, kun taas tetrasubstituoitujen estereiden todettiin olevan erittäin rasvaliukoisia. Trisubstituoitu johdannainen oli myös riittävän pysyvä kemiallisessa hydrolyysissä, mutta entsymaattisessa hydrolyysissä vapautti etidronaatin.^{41, 89}

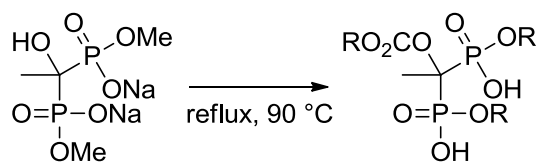
Myöhemmin Turhanen *et al.*⁸³ tutkivat mm. trialkyylialkyylikarbonaattiestereiden valmistusta dimetyylietidronaatista ja alkyylidiklooriformiaatista. Johdannaisten valmistusmenetelmä kehiteltiin käyttämällä odottamattomia demetylaatio- ja dekarboksylaatioreaktioita. Nämä odottamattomat reaktiot selittivät myös osin miksi etidronaatin kaltaisten bisfosfonaattien alkyylidikarbonaattihiolääkkeitä on vaikea valmistaa.

Etidronaatin dimetyyliesteridinaatriumsuola sekoitettiin ylimäärään etyyliklooriformiaattia, minkä jälkeen 3 eq. NaHCO₃:a lisättiin ja reaktioseosta refluksoitettiin yön yli. Reaktiotuote oli etidronaatin ei-symmetrinen alkyylidikarbonaattiesterijohdannainen (Kuva 36). Siinä kaksi metyyliiryhmää ja kaksi natriumionia on muuttunut kolmeksi etyyliiryhmäksi ja yhdeksi etoksikarbonyyliiryhmäksi.



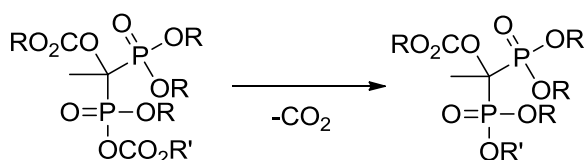
Kuva 36. Etidronaatin alkyylidikarbonaattiesterijohdannainen.

Samaan alkyylidikarbonaattiesterijohdannaiseen päästiin, kun etidronaatin trietyyliesterikaliumsuola sekoitettiin 1 eq. NaHCO₃ ja ylimäärään etyyliklooriformiaattia kanssa asetonitrilissä ja refluksoitettiin 41 h. Sama toistui, kun synteesissä käytettiin joko metyyli- tai butyyliklooriformiaattia. Kun synteesissä käytettiin butyyliklooriformiaattia ja reaktioseosta lämmitettiin +90 °C:ssa, syntyi diesterialkyylidikarbonaattijohdannainen (Kuva 37).



Kuva 37. Vaihtoehtoinen valmistustapa alkyylidikarbonaattiesterijohdannaiselle.

Tetraesterijohdannainen saadaan dekarboksyloimalla alkyylidikarbonaattiesterijohdannainen (Kuva 38).

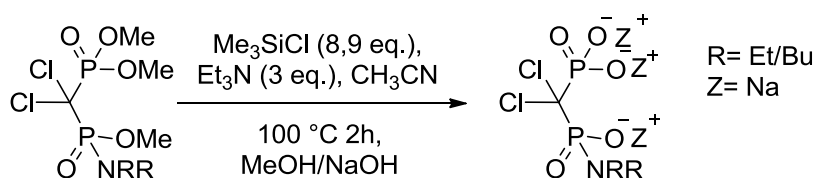


Kuva 38. Alkyylikarbonaattitetraesterijohdannaisen valmistus.

8.3 Klodronaattijohdannaiset

Klodronaatin ja sen johdannaisten valmistamista ja tutkimista hankaloittaa niiden kromoforisen ryhmän puute, minkä vuoksi niitä on mahdotonta havaita suoraan UV-absorptiolla ilman derivatisointia. Sen sijaan niitä voitaisiin tutkia erityisellä HPLC-valonsirontadetektorin yhdistelmällä. Klodronaattista voidaan valmistaa esimerkiksi selektiivisesti mono-, di-, ja trisubstituoituja esteri-, amidi-, asyylioksi- ja anhydridijohdannaisia. Johdannaisten toimimista aihiolääkkeinä on myös tutkittu. Esimerkiksi klodronaatin monoesterit eivät vapauttaneet klodronaattia kemiallisessa tai entsymaattisessa hydrolyysissä.^{41,90}

Niemi *et al.*⁹¹ tutkivat klodronaatin osittaisia amidijohdannaisia. Pysymättömämpiä johdannaisia saatiin, kun klodronaatti sisälsi yksi, kaksi tai kolme amidisidosta esterisidosten sijaan. Klodronaatin jotkin amidijohdannaiset kylläkin vapauttivat klodronaatin, mutta vain kemiallisen hydrolyysin avulla. Tämä luonnollisesti rajoitti amidijohdannaisten käyttöä. Monoamideja voidaan kuitenkin pitää lupaavina välituotteina kemialliselle hydrolyysille alttiita aihiolääkkeitä suunnitellessa (Kuva 39).

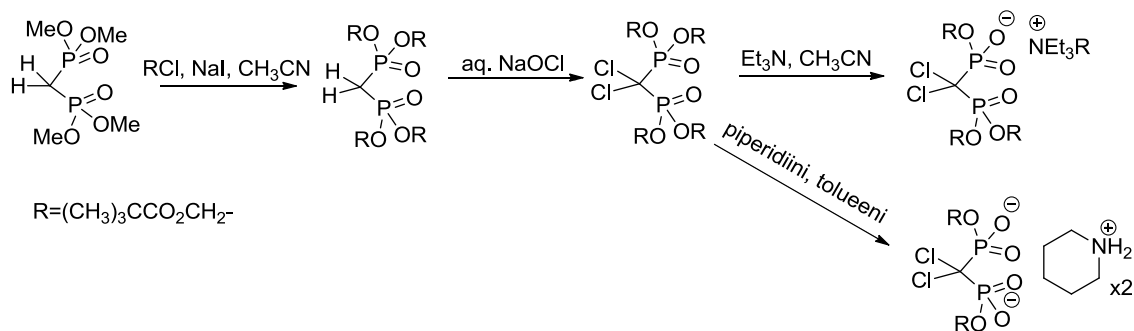


Kuva 39. Klodronaatin monoamidin valmistus.

Niemi *et al.* valmistivat myös klodronaatin asyylioksi- ja alkyylisteri- ja aryylisteri- estereitä. Aiemmin oli havaittu, etteivät klodronaatin yksinkertaiset alkyyli- tai aryylisterit voi olla klodronaatin aihiolääkkeitä, koska ne ovat hydrolyyttisesti pysyviä. Tutkimusryhmä valmistikin siksi di-, tri- ja tetrasubstituoituja klodronaattijohdannaisia (Kuva 40). Niistä

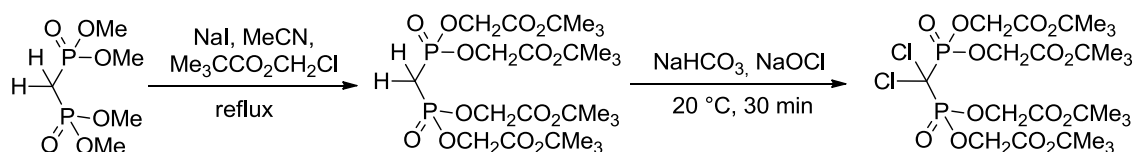
klodronaatin pivaloyylioksimetyyliesterit hydrolysoituivat nopeasti klodronihapoksi. Seerumissa ne olivat pysyviä, mutta kvantitatiivinen hydrolyysi tapahtui kanin maksan homogenaatissa. Sen sijaan esimerkiksi bentsoyylioksimetyyliesterit olivat entsyymaattisesti ja kemiallisesti stabiileja, eikä niitä siten voisi käyttää aihiolääkkeenä.

90-92



Kuva 40. Klodronaatin di-, tri- ja tetrasubstituoidun johdannaisen valmistus.

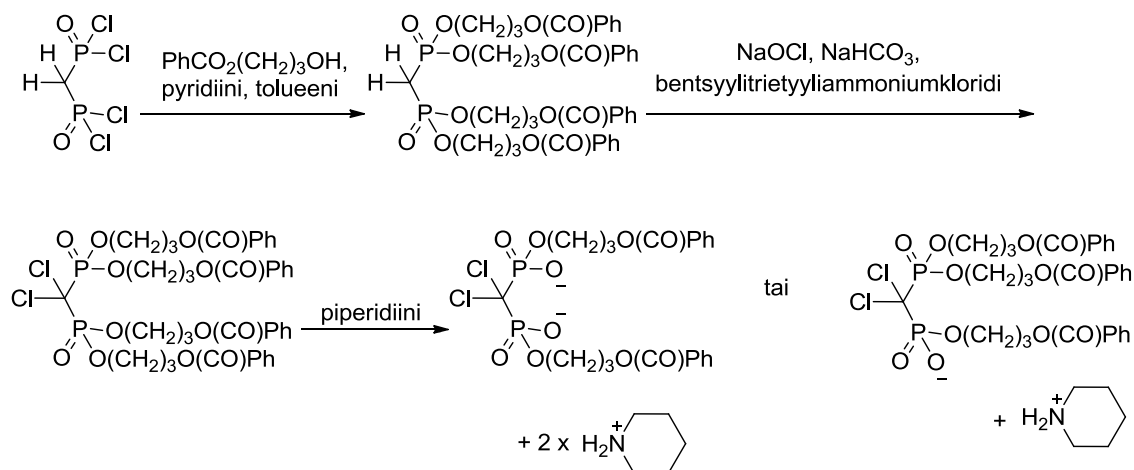
Klodronaatin pivaloyylioksimetyyliesterien valmistukseen käytettiin vaihtoesteröintiä. Tetrametyylimetyleenibisfosfonaatti reagoi ylimäärän pivaloyylimetyylikloridia kanssa NaI:n ja asetonitriilin läsnä ollessa (Kuva 41). Sen jälkeen (tetrapivaloyylioksimetyyli)metyleenibisfosfonaatin metyleenihiili halogenoitiin käyttäen NaOCl:a klooraavana tekijänä, jolloin saatiin tetraesterijohdannainen. Tri- ja diesterijohdannaisten valmistamiseksi käytettiin tertiäärisiä ja sekundäärisiä amiineja dealkyloijina.^{93, 94}



Kuva 41. Klodronaatin pivaloyylioksimetyyliesterin valmistus.

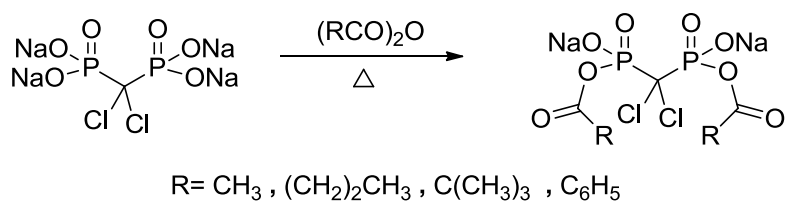
Klodronaatin bentsoyylioksimetyyliesterien valmistus aloitettiin antamalla bentsaldehydin reagoida propyleeniglykolin kanssa, jolloin saatiin aikaan syklinen asetaali, 2-fenyyl-1,4-dioksolaani. Asetaalin reagoidessa *tert*-butyylihydroperoksidin ja vanadyyliasetaanin kanssa rengas aukesi tuottaen 3-hydroksipropyylibentsoaattia. Bentsoaatti reagoi seuraavaksi yhdisteen kanssa, joka oli valmistettu tetraisopropyylimetyleenibisfosfonaatin reagoidessa sublimoituneen fosfori-

pentakloridin kanssa vedettömässä ympäristössä. Tetra(bentsoyylioksialkyyli)esterin metyylihiili kloorattiin hieman emäksisissä olosuhteissa natriumhypokloriitilla bentsyylietyyliammoniumkloridin ollessa läsnä faasinsiirtokatalyyttinä. Näin saatiin haluttu tetraesteri. Tästä tetraesteristä valmistettiin tri- ja *P,P'*-dibentsoyylioksi-propyyliesterit käyttämällä piperidiiniä selektiivisenä dealkyloijana (Kuva 42).^{92, 94, 95}



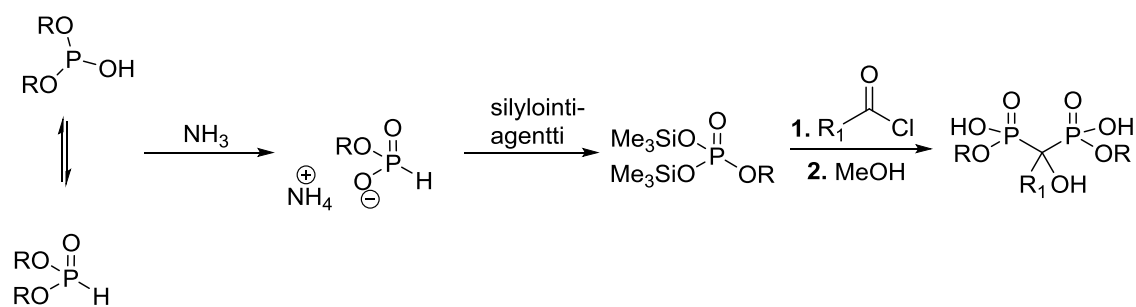
Kuva 42. Klodronaatin dibentsoyylioksi-propyyliesterin valmistus.

Klodronaatin dianhydridien valmistamiseen käytettiin klodronaatin tetranatriumsuolaa, jonka annettiin reagoida suuren ylimäärän vastaavaa anhydridiä kanssa. Klodronaatista saatiin valmistettua asetyyli-, butyryyli-, pivaloyyli- ja bentsoyyli johdannaisia (Kuva 43).



Kuva 43. Klodronaatin dianhydridin valmistus.

1-Hydroksimetyyleeni-1,1-bisfosfonihapot voidaan muokata erilaisiksi diestereiksi. Tähän Monteil *et al.*⁹⁶ käyttivät bis(trimetyylisilyyli)metyylifosfiittia ja happokloridia (Kuva 44).



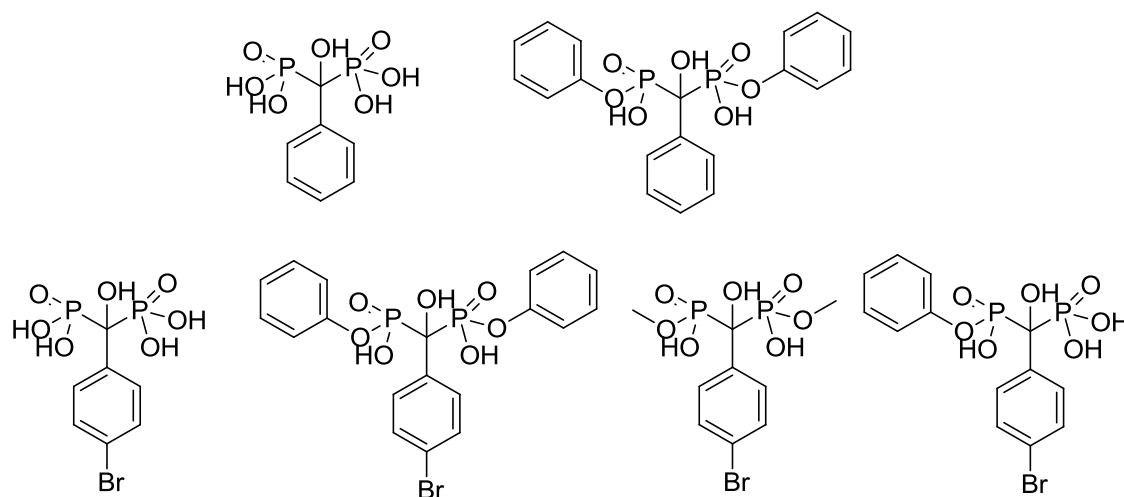
Kuva 44. Bisfosfonihapon diesterin valmistus.

Tutkimusryhmä oli aiemmin esitellyt miedon ja yhdessä astiassa tehtävän synteesin vaihtoehdoksi aiemmille mm. termisesti epästabiileille tekniikoille.

Alkyyli- tai aryylibis(trimetyylisilyyli)metyylifosfonaatit saatiin valmistamalla kohdemolekyylit vastaavista dialkyylifosfonaateista. Dialkyylifosfonaatit dealkyloitiin ensin 30 %:lla ammoniakilla ja silyloitiin sen jälkeen saadut ammoniummonoalkyyli- tai aryyli- tai fosfonaatit.⁹⁶ Reaktiot ovat hyvin eksotermisiä ja ammoniakkin lisäyksen pitää tapahtua lämpötilan ollessa 0 °C. Reaktioajat vaihtelevat yhdestä tunnista yhteen vuorokauteen. Saadut silyylifosfonaatit reagoivat sitten happokloridin kanssa. Hydrolyysin jälkeen saatiin vastaavat hydroksimetyleenibisfosfonidiestereit. Ammoniumfosfiitit piti tislata pyridiin ja bentseenin kanssa, jotta vesi saatiin haihdutettua kokonaan pois. Lukemattomista testatuista silylointireagensseista heksametyylidisilatsaani antoi parhaat tulokset.

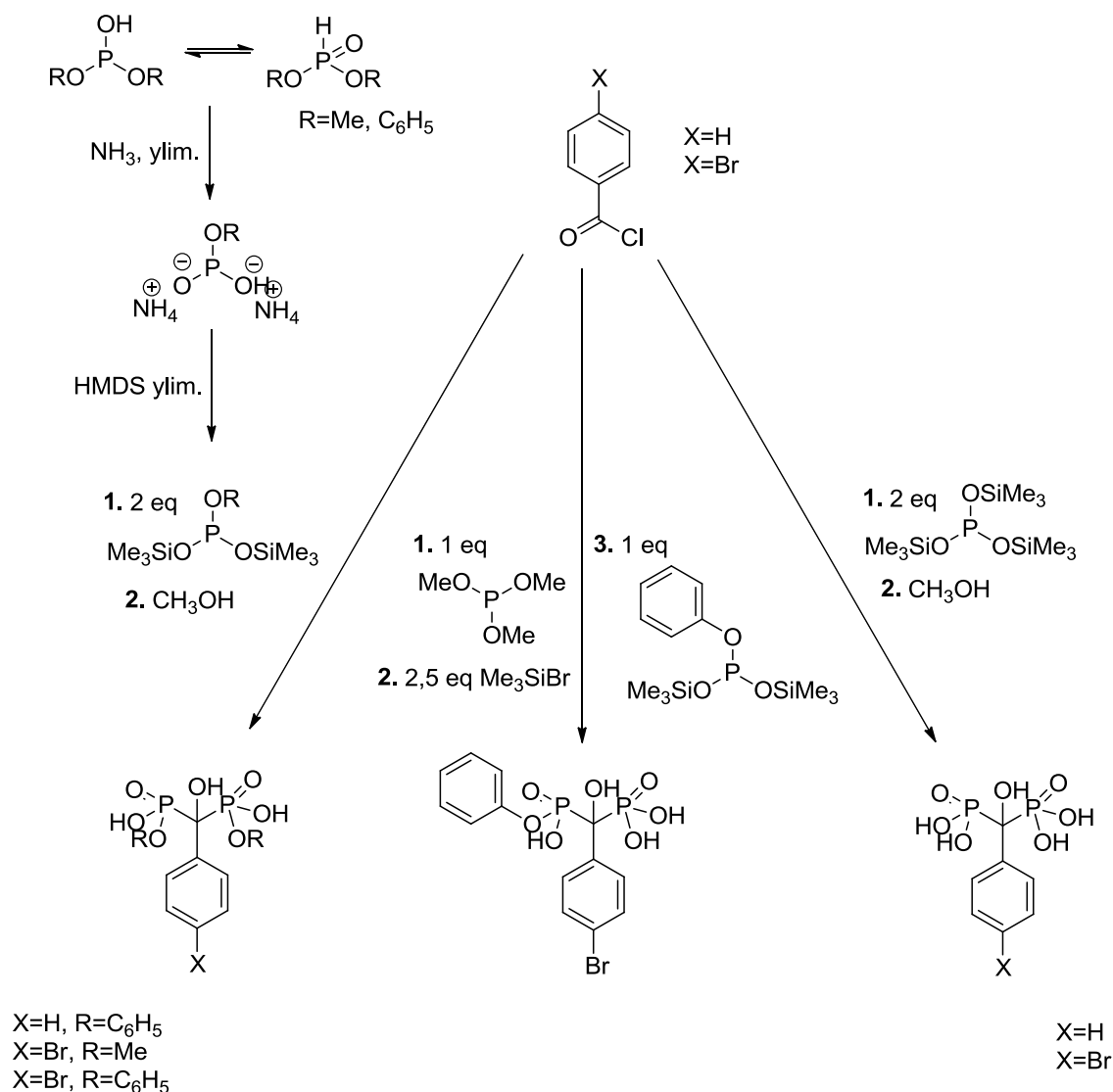
8.4 Aromaattiset hydroksibisfosfonaattiesterit

Fenyylin tai *p*-bromifenyylin liittämisen hydroksibisfosfonaatteihin on todettu parantavan niiden inhiboivaa vaikutusta useita syöpäsolulinjoja vastaan, *in vitro* ja/tai *in vivo*.⁹⁷ G- ja Ras-proteiinit ovat usein mutatoituneita maksasolusyövässä. FPP ja GPP ovat tärkeitä G- ja Ras-proteiinien signaloinnissa, joten signaalin estyminen estäisi myös proteiinien mutatoitumisen. Monteil *et al.*⁹⁷ valmistivat kuusi erilaista *p*-bromifenyyl- tai fenyylihydroksibisfosfonaattijohdannaista johtamalla niistä metyyli-, monofenyyl- tai difenyyliestereitä (Kuva 45).



Kuva 45. Bisfosfonaatin fenyyl- ja *p*-bromifenyyljohdannaiset.

Johdannaiset valmistettiin antamalla 2 eq tris(trimetyylisilyyli)fosfiittia tai metyyli- tai fenyylibis(trimetyylisilyyli)fosfiittia reagoita sopivan happokloridin kanssa (Kuva 46).⁹⁷ Liuottimet haihdutettiin pois ja reaktioseokset käsiteltiin metanolilla, minkä jälkeen tuotteet puhdistettiin uudelleenkiteyttämällä ne sopivasta liuottimesta. Tuotteet olivat jauhemaisia ja niillä oli hyvä, 70-95 %:n saanto. Dimetyyliesterin onnistuneeseen valmistamiseen tarvittiin 1 eq fenyylibis(trimetyylisilyyli)fosfiittia ja *p*-bromibentsoyylidikloridia, jotka kondensoitiin -10 °C:ssa. Lisäyksen jälkeen reaktioseosta pidettiin huoneenlämmössä 2 tuntia, minkä jälkeen liuottimet haihdutettiin pois ja saatiin *p*-bromifenyyl- α -ketofosfonaatin metyyliesteri. Metyyliesteri muutettiin di(trimetyylisilyyli)esteriksi antamalla reaktioseoksen reagoita 2,5 eq bromitrimetyylisilyylin kanssa viiden tunnin ajan. Liuottimet haihdutettiin pois ja lisättiin 1 eq fenyylibis(trimetyylisilyyli)fosfiittia argon-ilmakehässä 0 °C:n lämpötilassa. Reaktioseoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 2 tunnin ajan. Lopuksi liuottimet haihdutettiin pois ja reaktioseos käsiteltiin metanolilla. Saostuma pestiin eetterillä ja eristettiin hyvällä, 90 %:n saannolla.



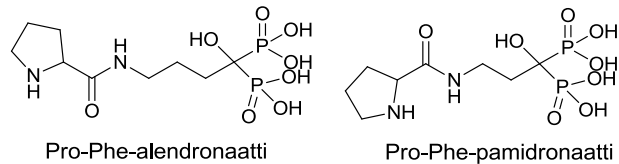
Kuva 46. *p*-Bromifenyyl- ja fenyylihydroksidibisfosfonaattien valmistus.

8.5 Bisfosfonaattien konjugointi muihin lääkeaineisiin tai makromolekyyleihin

Bisfosfonaatteja voidaan konjugoida myös muihin lääkeaineisiin tai molekyyliin. Bisfosfonaatit saattavat parantaa muiden lääkeaineiden ja molekyylien imeytymistä ja/tai muut lääkeaineet ja molekyyli bisfosfonaattien imeytymistä. Kun kaksi lääkeainetta on konjugoitu toisiinsa niiden ominaisuuksien parantamiseksi, tätä aihiolääkettä kutsutaan silloin yhteislääkkeeksi (co-drug).

8.5.1 Peptidyyli-alendronaatti- ja -pamidronaattijohdannaiset

Ezra *et al.* tutkimuksessa¹⁷ valmistettiin alendronaatista ja pamidronaatista peptidyyliaihiolääkkeitä, prolyylifenyylialanyylialendronaattia ja -pamidronaattia (Kuva 47).



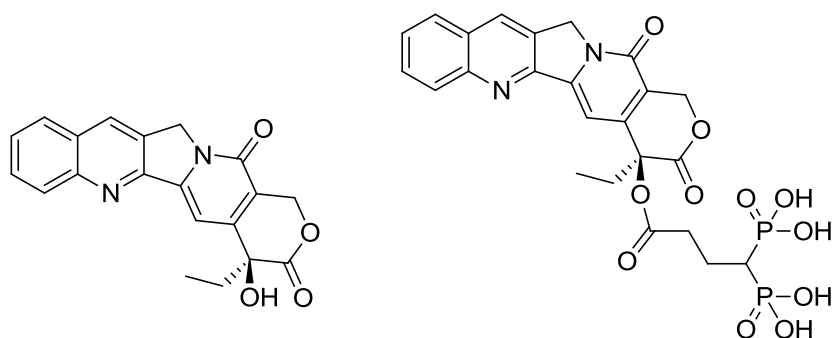
Kuva 47. Alendronaatin ja pamidronaatin peptidyylijohdannaiset.

Tarkoituksena oli parantaa bisfosfonaattilääkkeen imeytymistä hyödyntämällä suoliston peptidinkuljetussysteemiä. Aihiolääkkeen odotettiin kulkeutuvan aktiivisesti sytosoliin ja hydrolysoituvan myöhemmin sytosolin entsyymien avulla isäntälääkkeeksi. Tutkimustulokset osoittivat, että suun kautta nautitut peptidyylijohdannaiset paransivat bisfosfonaattien imeytymistä kolminkertaisesti (rotilla). Kun aihiolääkkeiden ja isäntälääkkeiden antamia tuloksia vertailtiin, oli pamidronaatin aihiolääkettä nautittaessa bisfosfonaattijäännöstä erittyneenä virtsaan kolme kertaa enemmän kuin itse pamidronaattia nautittaessa. Alendronaatin tapauksessa jäännöstä oli virtsassa kaksi kertaa enemmän. Aihiolääkkeiden biosaatavuus laskettiin lääkkeen kerääntymisestä sääriluuhun ja virtsaan. Arvot arvioitiin suun kautta nautitun lääkkeen ja suonensisäisesti annetun lääkkeen suhteesta 24 tuntia lääkkeenoton jälkeen. Bisfosfonaatin kertymä luuhun osoitti aihiolääkkeiden parantavan biosaatavuutta kaksinkertaisesti. Virtsasta mitattujen arvojen todettiin parantavan biosaatavuutta noin nelinkertaisesti. Hydrolyysin todettiin tapahtuvan tyhjäsuolen limakalvoilla. Merkittävää hydrolysaatiota ei tapahtunut keinotekoisessa mahanesteessä eikä ruoansulatuskanavassa.¹⁷

8.5.2 Bisfosfonaattien konjugointi kamptotesiiniin ja tryptofaaniin

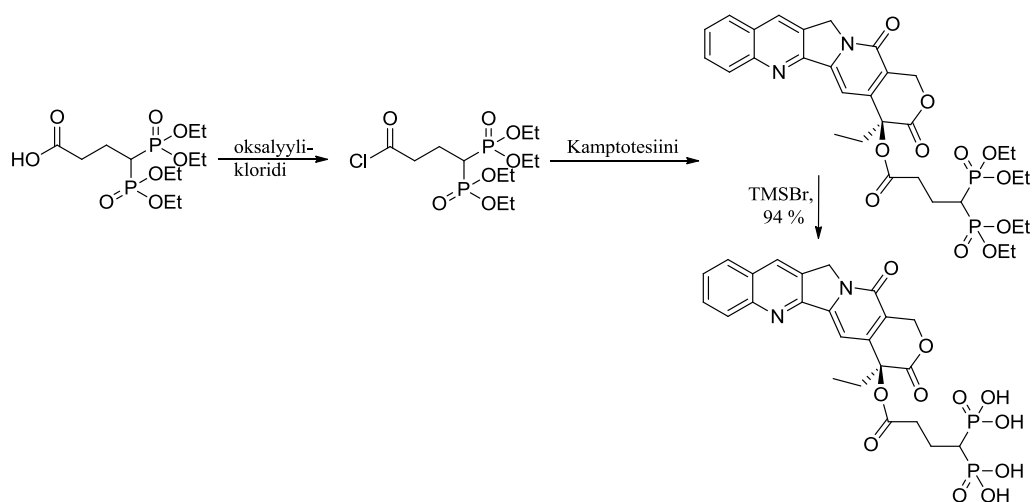
Bisfosfonaatteja voidaan konjugoida kamptotesiiniin ja tryptofaaniin kanssa joko liittämällä ne bisfosfonaattiin esterisidoksella tai käyttämällä siltamolekyyliä aminoryhmän sisältävän yhdisteen ja bisfosfonaatin välillä.⁹⁸ Erez *et al.* konjugoivat bisfosfonaatin tunnettuun kemoterapeuttiseen lääkeaineeseen, kamptotesiiniin.

Muodostunutta yhdistettä kutsuttiin kamdronaatiksi. Kamptotesiini (Kuva 48) itsessään on erittäin huonosti liukeneva toisin kuin bisfosfonaatit ja sillä on toksisia sivuvaikutuksia. Joitain sivuvaikutuksia on pystytty poistamaan muuntamalla kamptotesiinimolekyylin rakennetta. Kamdronaatti (Kuva 49) hakeutuu kohti luukudosta bisfosfonaattiosan ansiosta, minkä jälkeen kamptotesiini hydrolysoituu hitaasti.



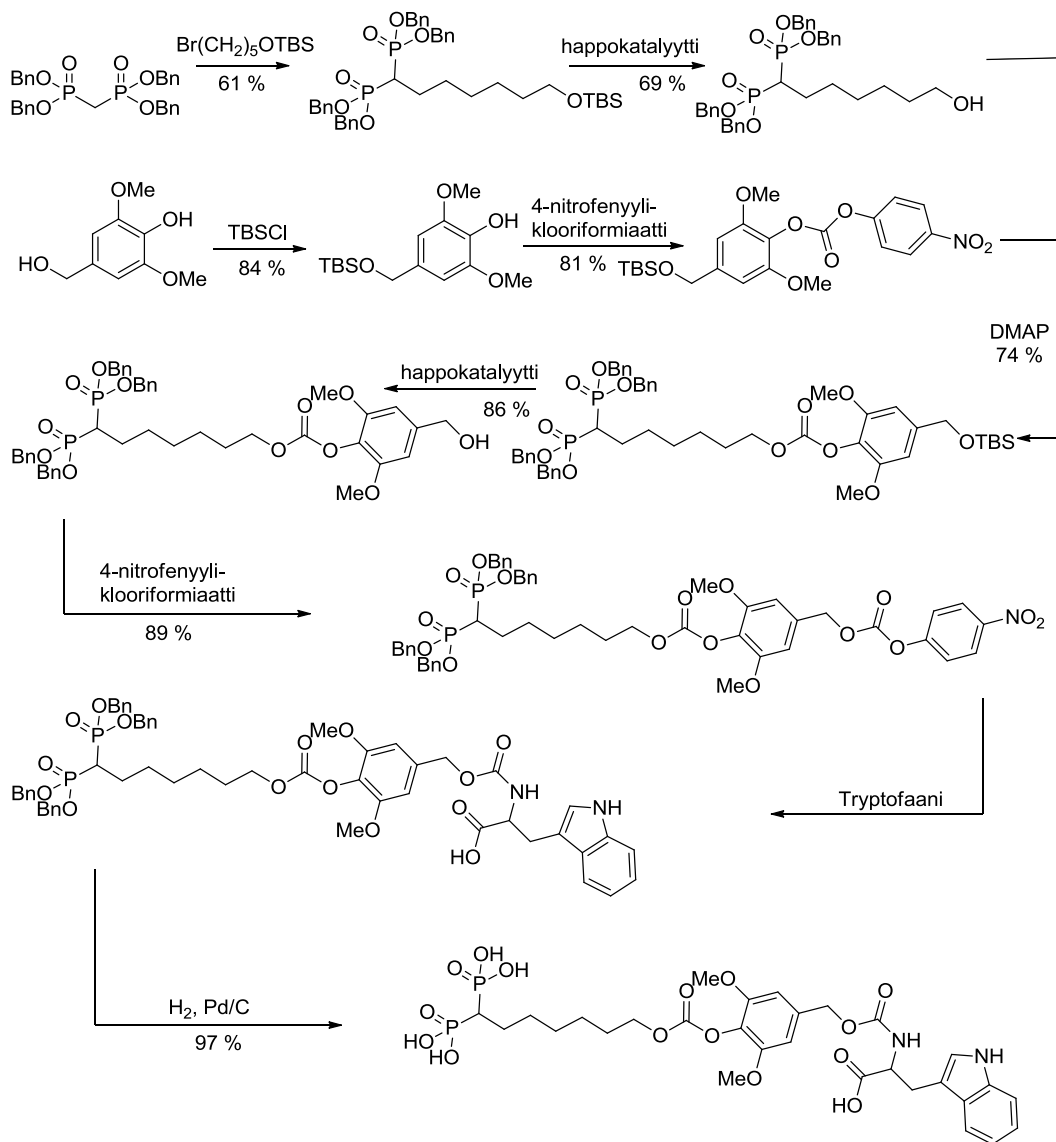
Kuva 48. Kamptotesiini ja kamdronaatti

Kamdronaatin valmistus aloitettiin klooraamalla bisfosfonaatti-voihappojohdannainen oksalylikloridilla (Kuva 49).⁹⁸ Sen jälkeen kamptotesiini asetyloitiin edellä saadulla asyylikloridilla ja tuloksena saatiin kamptotesiinin esterimuoto. Esteriryhmät poistettiin trimetyylisilylibromidilla, minkä jälkeen saatiin kamdronaatti. Bisfosfoni happo-osa muokattiin vesiliukoisemmaksi natriumsuolaksi sopivalla määrällä NaOH:a.



Kuva 49. Kamdronaatin valmistus bisfosfonaatti-voihappojohdannaisesta.

Liitettäessä bisfosfonaatteja aminohappoihin, esimerkiksi valittiin (L)-tryptofaani jossa on vapaa aminoryhmä.⁹⁸ Bisfosfonaatti yhdistettiin labiiliin karbonaattisidoksen kautta 4-hydroksi-3,5-dimetoksi-bentsyylialkoholiin. Tryptofaani yhdistettiin näin saatuun stabiiliin molekyyliin karbamaattisidoksen kautta. Lopulta trypdronaatin esterimuoto hydrattiin palladiumkatalyytin avulla trypdronaattiksi (Kuva 50).



Kuva 50. Trypdronaatin valmistus tetrabentsyylibisfosfonaatista.

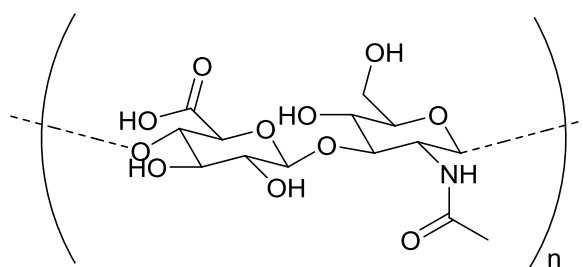
Tetrabentsyylibisfosfonaatti reagoi suojatun bromiheksanolin kanssa. Suojauksen jälkeen saatiin molekyyli alkoholimuotoon.⁹⁸ Sillä välin 4-hydroksi-3,5-dimetoksibentsyylialkoholi suojattiin selektiivisellä silyloinnilla, jotta saatiin aikaan fenoli, joka sitten asyloitiin 4-nitrofenyyliklooriformiaatilla. Aiemmin saatu alkoholi liitettiin äsken valmistettuun karbonaattiin. Suojaus poistettiin happokatalyytin läsnäollessa ja molekyyli saatiin alkoholimuotoon. Seuraavaksi alkoholi asyloitiin 4-

nitrofenyyliklooriformiaatilla; alkoholi reagoi sen kanssa muodostaen uuden karbonaattisidoksen. Syntynyt yhdiste liitettiin tryptofaaniin ja bentsyyliisuojuukset poistettiin katalyyttisen hydrolyysin avulla. Lopputuotteena saatiin tryptonaattia.

Sekä kamdronaatti että tryptonaatti osoittivat sitoutumiskykynsä hydroksiapatiittiin ja aktivoituivat hydrolyyttisesti fysiologisissa olosuhteissa.⁹⁸ Kamdronaatin todettiin olevan 10 kertaa vähemmän toksinen kuin itse kamptotesiini. Kamptotesiini vapautui bisfosfonaatista 300 tunnin aikana, eikä sillä todettu olevan affiniteettia HAP:ia kohtaan. Tryptofaani vapautui bisfosfonaatista 170 tunnin aikana, eikä silläkään todettu olevan affiniteettia HAP:ia kohtaan. Karbonaattisidos hajoaa hydrolyyttisesti puoliintumisajan ollessa 90 h.

8.5.3 Hyaluronaani-bisfosfonaattikonjugaatit

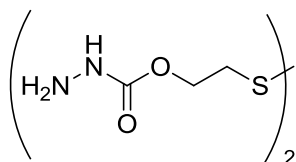
Hyaluronaani-bisfosfonaattikonjugaatti on lääkeaine, joka kulkeutuu paikallisesti ja vaikutus kohdistuu tiettyä solutyyppeä kohtaan.⁹⁹ Lääkeaine on hydrogeelimuodossa, jolloin se on injektoitavissa. Pienten molekyylien käyttö hydrogeelimuodossa on haastavaa, koska ne saattavat poistua huokoisesta geelistä passiivisen diffuusion kautta. Hyaluronihappo (HA) on glykosaminoglykaani-polymeria, pitkäketjuista haarautumatonta polysakkaridia, jota esiintyy miltei jokaisessa kudoksessa. Sen toistuvassa yksikössä d-glukuronihappo on liittynyt *N*-asetyyli-glukosamiiniin (Kuva 51).



Kuva 51. Hyaluronaanin toistuva rakenneyksikkö.

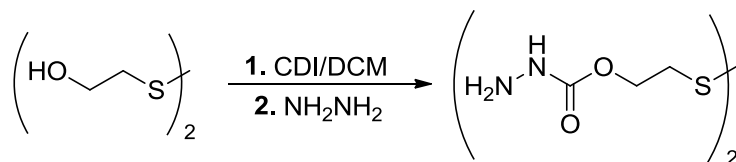
Varghese *et al.*⁹⁹ valmistivat aminobisfosfonaatti-hyaluronaanijohdannaisen, jolla on polymeereille ominainen silloittumiskyky. Sen hydratsidirymä reagoi perjodaatilla hapetetun polyaldehidihyaluronihapon kanssa muodostaen hydrogeelin alle 30 sekunnissa. Johdannaisen valmistukseen käytettiin itsestään hajoavaa siltamolekyyliä,

joka hajoaa harmittomiksi sivutuotteiksi, johdannaisen kuljettua kohteeseensa. Hyaluronihapon karboksylaattiin kiinnittyessään siltamolekyylillä tarjoaa vapaan hydratsidiryhmän. Tässä tapauksessa siltamolekyylillä on kaksi funktionaalista ryhmää (kuva 52).



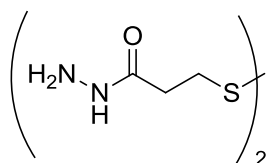
Kuva 52. Siltamolekyylillä biskarbatsaatti.

Johdannaiseen saatiin hydratsidi- ja tioliryhmän ansiosta sekä silloitusominaisuuden omaava ryhmä että bioaktiivinen ligandi.⁹⁹ Siltamolekyylillä, joka on biskarbatsaatti, valmistettiin aktivoimalla 2,2-ditiodietanoli 2 eq karbonyyli-imidatsolilla (CDI). Siltamolekyylillä johdannaista varten saatiin sitten liittämällä 2,2-ditioetanoliiin hydratsiini (Kuva 53). Disulfididoksen hajoamisen seurauksena pitäisi muodostua epästabiileja 2-tioetylikarbatsaattijäännöksiä, jotka käyvät läpi spontaanin etyleeniepisulfidin ja hiilidioksidin eliminaation ja vapauttaen lopulta hydratsidiryhmän.



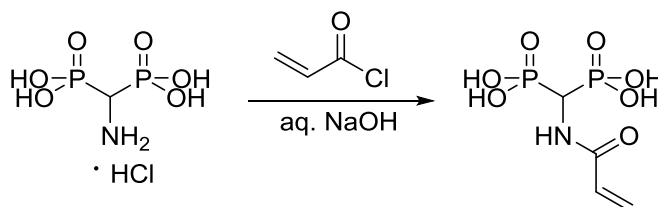
Kuva 53. Biskarbatsaatin valmistus 2,2-ditiodietanolista.

Juuri valmistetun siltamolekyylin lisäksi synteesissä käytettiin myös toista siltamolekyylillä, ditiobis(propionidihydratsidi):a (Kuva 54). Siltamolekyylejä käytettiin synteesissä 1:1 suhteessa.^{99, 100}



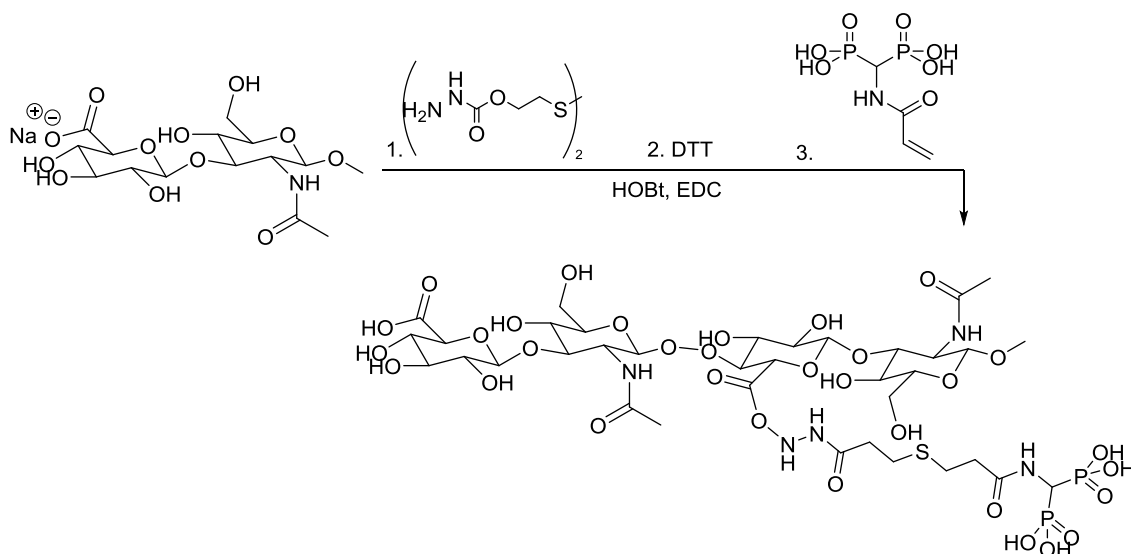
Kuva 54. Ditiobis(propionidihydratsidi).

Akryyliamidometyleenibisfosfonaattia käytettiin reaktiossa Michaelin vastaanottajana. Se valmistettiin akryloimalla aminobisfosfonaatti käyttäen akryloyylikloridia NaOH-liuoksessa (Kuva 55).



Kuva 55. Akryyliamidobisfosfonaatin valmistus aminobisfosfonaatista.

Bisfosfonaatti-hyaluronaanijohdannainen saadaan Michaelin additioreaktiolla sen jälkeen, kun biskarbatsaatti on ensin liitetty hyaluronaaniin standardi-EDC -olosuhteissa ja disulfididisidos pelkistetty DTT:n avulla. Siten saadaan haluttu hyaluronaanibisfosfonaattijohdannainen (Kuva 56).



Kuva 56. Bisfosfonaatti-hyaluronaanijohdannaisen valmistus.

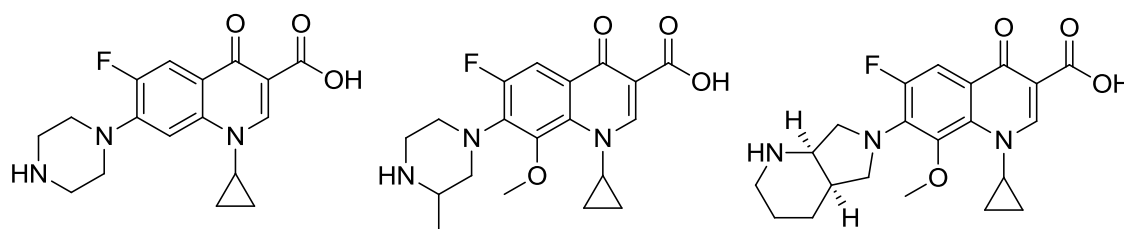
Hydrogeelitestissä johdannainen liuotettiin PBS-puskuriin ja ruisku täytettiin 2% liuoksella.⁹⁹ Muodostunut geeli omai viskoelastisia ominaisuuksia. Johdannaisten sytotoksisia ominaisuuksia haluttiin myös tutkia. Koska bisfosfonaatit estävät osteoklastien erilaistumista, ne voivat käyttää samaa apoptista vaikutusta myös syöpäsoluihin. Paikallinen kuljetus vähensi bisfosfonaatin toksisia vaikutuksia. Hyaluronidaasi (entsyymi, joka hajottaa hyaluronihappoa), ei vapauttanut bisfosfonaattia sen alkuperäisessä muodossa, vaan erilaisina amidijohdannaisia. Tämä

voi heikentää sen vahvuutta verrattuna vapaaseen bisfosfonaattiin. Hyaluronidaasi pilkkoo johdannaisen sopiviin palasiin, jotka solut ottavat sisäänsä CD44-reseptoriavusteisella endosytoosilla. Hydrogeelimuoto sallisi kontrolloidun ja selektiivisen vapautumisen.

8.5.4 Fluorokinoni-bisfosfonaattikonjugaatit

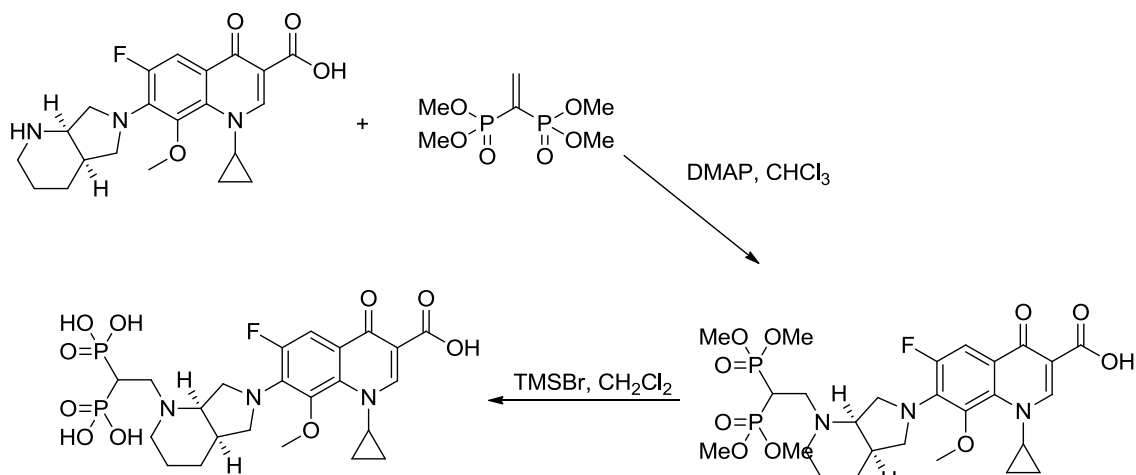
Fluorokinoni-bisfosfonaattijohdannaisissa bisfosfonaatti on liitetty fluorokinolonin vapaaseen aminoryhmään.¹⁰¹ Fluorokinoni-bisfosfonaattijohdannaiset voisivat toimia osteotrooppisina aihiolääkkeinä luun tai luukudoksen infektion tai tulehduksen hoitoon. Infektioiden hoitoon tarvitaan usein suuria määriä antibiootteja. Antibioottien kohdistaminen luuhun annostelun jälkeen voisi tehostaa lääkkeen vaikutusta ja harventaa lääkkeen annostelukertoja. *Staphylococcus aureus* -bakteerin aiheuttama hoitamaton infektio voi johtaa nekroosiin. Se voi syntyä ja ilmetä luukudokseen muodostuneena vauriona fyysisen trauman aiheuttamana tai kromosomin lokuksessa vähentyneen verisuonittumisen seurauksena.

Fluorokinolonit ovat täysin synteettisiä antibakteerisia yhdisteitä.¹⁰¹ Niitä on helppo valmistaa ja muokata. Houghton *et al.*¹⁰¹ käyttivät fluorokinoloni-bisfosfonaattien valmistuksessa fluorokinoloneista siprofloksasiinia, gatifloksasiinia ja moksifloksasiinia. Ne eroavat toisistaan fluorokinolonin bentseenirenkaaseen liittyneen ryhmän mukaan (Kuva 57).



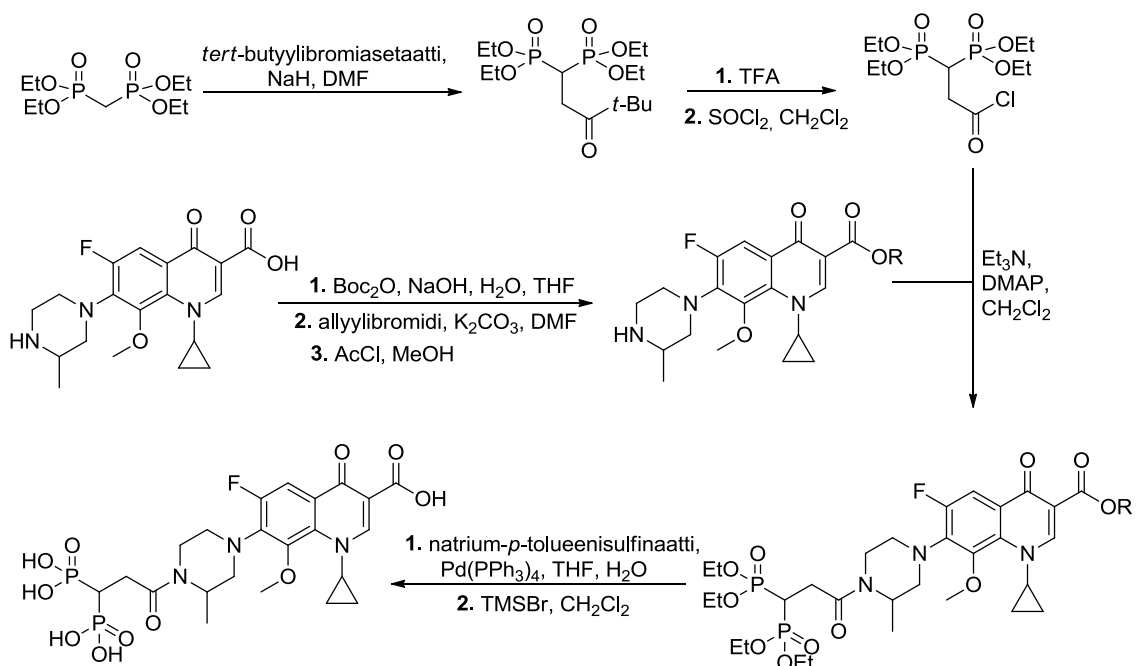
Kuva 57. Siprofloksasiini, gatifloksasiini ja moksifloksasiini, vasemmalta oikealle.

Fluorokinoni-bisfosfonaattijohdannaisia voitiin valmistaa eri tavoin.¹⁰¹ Esimerkiksi moksifloksasiini liitettiin additiolla 1,1-etenyylibisfosfonaattiin, jonka esterisuojaus poistettiin TMSBr:n avulla (Kuva 58).



Kuva 58. Moksifloksasiini-bisfosfonaattijohdannaisen valmistus.

Toisessa synteesireitissä aminoryhmä Boc-suojattiin ensin, jotta gatifloksasiini saatiin esteröityä (Kuva 59).¹⁰¹ Esterit asetyloitiin sitten bisfosfonaatin asylikloridilla, joista suojauksen poistamisen jälkeen saatiin gatifloksasiinin bisfosfonoituja amideja.



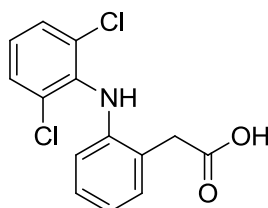
Kuva 59. Gatifloksasiini-bisfosfonaattijohdannaisen valmistus.

Pienimmät inhibointikonsentraatiot olivat johdannaisilla yleisesti korkeammat kuin pelkillä fluorokinoloneilla.¹⁰¹ Kun fluorokinolonit vapautetaan aihio-osastaan, niiden aktiivisuus kasvaa. Voidaankin ajatella, että aihiolääkkeiltä puuttuu merkittävä antibakteerinen aktiivisuus. Tutkimustulosten mukaan osa aihiolääkkeistä vapautti

riittävästi isäntälääkettä aktiivisuuden ylläpitämiseksi. Jotkin aihiolääkkeistä eivät vapauttaneet isäntälääkkeitä ollenkaan. Jotkin lääkkeet estivät infektioiden etenemistä luussa ja luukudoksissa, mutta yleisesti niitä ei pidetty terapeuttisesti käyttökelpoisina luutulehduksen hoidossa.

8.5.5 Diklofenaakki-bisfosfonaattikonjugaatit

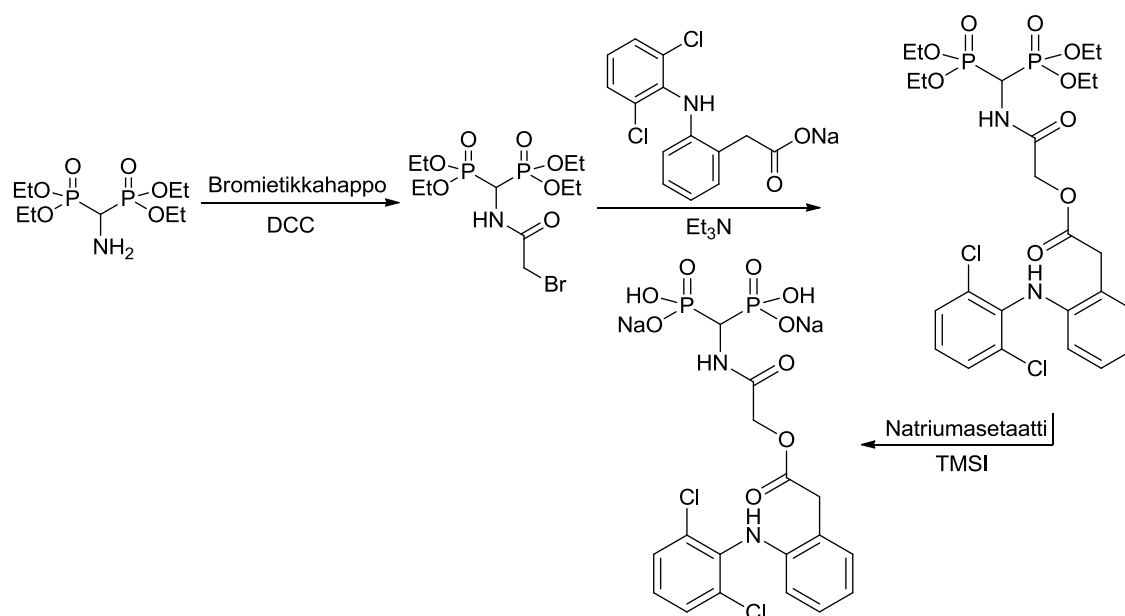
Diklofenaakki (Kuva 60) on kroonisen reumatismien hoitoon käytettävä lääke.¹⁰² Jotta sen terapeuttiset vaikutukset olisivat riittävät, joudutaan sitä annostelemaan toistuvasti. Tämä on potilaan kannalta ikävää, sillä diklofenaakilla on ikäviä sivuvaikutuksia. Sivuvaikutukset ovat samantyyllisiä kuin bisfosfonaateilla, eli ne liittyvät ruoansulatuskanavan ongelmiin. Näitä ongelmia pyrittiin välttämään yhdistämällä bisfosfonaatti ja diklofenaakki. Tulokset osoittivat diklofenaakki-bisfosfonaattijohdannaisten olevan toimivia aihiolääkkeitä mm. bisfosfonaattien osteotrooppisen lääkkeenkuljetussysteemin vuoksi.



Kuva 60. Diklofenaakki.

Konjugaatin synteesi (Kuva 61) aloitettiin bromietikkahapon ja DCC:n reagoissa tetraetyyliaminometyyli-bisfosfonaatin kanssa dikloorimetaanissa 0 °C:ssa tunnin ajan.¹⁰² Vuorokauden jälkeen reaktioseos suodatettiin ja suodoksesta haihdutettiin liuottimet pois. Suodosjäännös liuotettiin 50 ml:aan etyyliasetaattia ja orgaaninen kerros pestiin 0,5 M HCl:lla ja 4 % NaHCO₃-liuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin vedettömällä MgSO₄:lla ja haihdutettiin liuotin pois. Kiinteä reaktioseos uudelleenkiteytettiin etyyliasetaatti/dietyylieetteriliuoksesta, jotta saatiin tetraetylibromiasetamino-metyleenibisfosfonaatti. Tämä välituote reagoi natriumdiklofenaakin kanssa 4 ml:ssa trietyyliamiinia huoneenlämmössä 3 vuorokautta. Reaktioseos kaadettiin (30 ml) jääveteen ja saatua seosta uutettiin etyyliasetaatilla toistuvasti. Orgaaninen kerros kuivattiin vedettömällä MgSO₄:lla ja liuotin haihdutettiin pois. Saatua kiinteä aines liuotettiin 10 ml:aan dikloorimetaania ja lämpötila laskettiin -

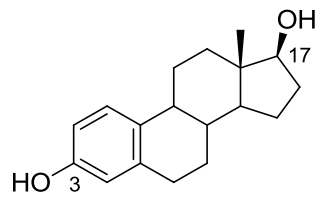
20 °C:seen. Seokseen lisättiin trimetyylisilylijodidia tiptoittain ja reaktioseosta sekoitettiin 3 tuntia 0 °C:ssa. Reaktioseokseen lisättiin 5 ml metanolia ja liuottimet haihdutettiin pois. Kiinteä aines liuotettiin etanoliin, lisättiin natriumasetaattia ja saostuma suodatettiin ja pestiin etanolilla.



Kuva 61. Diklofenaakki-bisfosfonaattijohdannaisen valmistus.

8.5.6 Estradioli-bisfosfonaattikonjugaatit

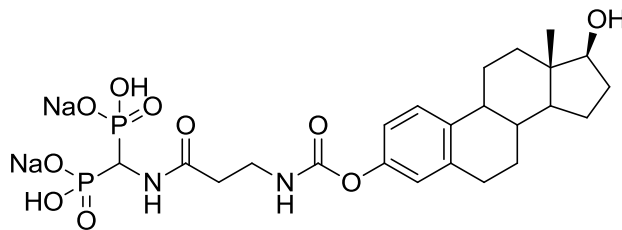
Estrogeeniä käytetään yleisesti vanhempien naisten osteoporoosin hoitoon. Vaikka se lisäksi luumassaa, se voi kuitenkin aiheuttaa epänormaalia kohdun verenvuotoa tai kehittää rinta- ja/tai kohtusyövän. Morioka *et al.*¹¹ kehittivät estradioli-bisfosfonaattikonjugaatin, jonka oletettiin kuljettavan estrogeenin suoraan luuhun bisfosfonaattien kuljetussysteemiä hyödyntämällä. Aiemmin oli yritetty valmistaa estradioli-bisfosfonaatti-konjugaatteja, jossa yhdisteet olivat yhdistettynä toisiinsa estradiolin 17-hiilestä erilaisten esteraasille herkkien siltamolekyylien avulla. Näillä konjugaateilla ei kuitenkaan havaittu luuhun kohdistuvia paikallisen aihiolääkkeen ominaisuuksia ilman systemaattisia vaikutuksia. Morioka *et al.*¹¹ tutkimuksissa havaittiin, että johdannaisesta tulee stabiilimpi, kun se konjugoidaan estradiolin 3- eikä 17-hiilestä (Kuva 62).^{11, 103}



Estradioli

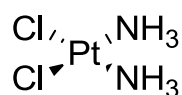
Kuva 62. Estradioli.

Yksi estradiolin 3-hiileen konjugoituista johdannaisista oli ((3-(17-hydroksi-1,3,5-estratrien-3-yylioksidikarbonyyliamino)-propionyyliamino)metyyli)bisfosfonaatti (Kuva 63).



Kuva 63. Estradiolin bisfosfonaattijohdannainen.

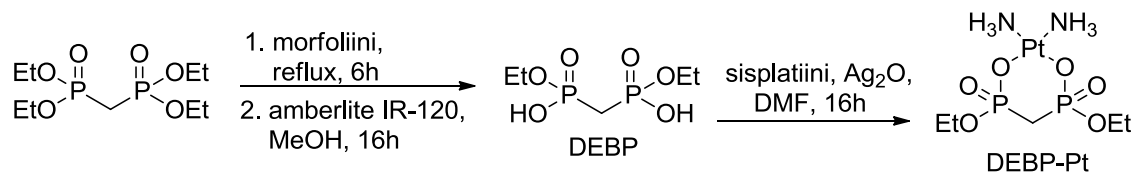
Johdannainen valmistettiin käyttämällä lähtöaineena meripihkahapon monobentsyyli-esteriä.¹¹ Kun käytetään difenyylifosforyyliatsidia (DPPA), esteri toisiintuu Curtius-toisiintumisella. Sen jälkeen estroni liitetään additioreaktiolla äsken saatuun isosyanaattiväli tuotteeseen (Kuva 64). Saatu karbamaatti debentsyloidaan katalyyttisellä hydrolyysillä, minkä seurauksena saadaan estronin C3-hiileen karbamaattisidoksella sitoutunut happo. Se kondensoidaan tetraetyyliaminobisfosfonaatin kanssa käyttäen isobutyliklooriformiaattia, mistä saatu tuote pelkistetään natriumboorihydridillä ja saadaan 17 β -alkoholimuotoon. Tetraetyyliesteriryhmät poistetaan silyloimalla ne trimetyylisilylijodidilla (TMSI), jolloin saadaan yllä kuvassa 63 oleva johdannainen.



Kuva 65. Sisplatiinimolekyyli.

Syöpää vastaan sisplatiini toimii imeytymällä solukalvon läpi, minkä jälkeen se aktivoituu kun vesimolekyyli syrjäyttää toisen kloridi-ioneista.¹⁰⁴ Vesi korvautuu solun sisällä helposti DNA:n emäksisillä typpi-atomeilla. Kun molekyyli on näin kiinnittynyt DNA:han, sen toinenkin kloridi-ioni korvautuu molekyylin kiinnittyessä vastinjuosteen guaniinityyppeen. Molekyyli on siis kiinnittynyt kahteen juosteeseen kaksoiskierteen sisällä. Näin se estää solujen mitoosia ja kasvaimen kasvua. Vaurioitunut DNA voidaan korjata entsyymien avulla, mutta syöpäsoluissa sitä ei tapahdu. Syöpäsolut kuolevat ja kasvain kutistuu.

Platina-bisfosfonaattikompleksi DEBP-Pt valmistettiin käyttämällä lähtöaineena tetraetyylimetyleenidifosfonaattia, joka muokattiin ensin *P,P'*-dietyyliesterimuotoon (Kuva 66).¹⁰⁴



Kuva 66. DEBP-Pt:n valmistus.

Tetraetyylimetyleenidifosfonaattia refluksoitettiin ensin morfoliinissa, jolloin saatiin dialkyloitu bisfosfonihapon morfoliinisuola. Suola käsiteltiin ioninvaihtohartsilla metanolissa, minkä jälkeen saatiin dietyylimetyyli-bisfosfonaatti (DEBP). DEBP ja sisplatiini reagoivat hopeaoksidin kanssa DMF:ssä. Saostunut hopeakloridi poistettiin ja DEBP-Pt-molekyyli uudelleenkiteytettiin metanolista.

Nakatake *et al.*¹⁰⁴ totesivat yhdisteen hajoavan vesiliuoksessa DEBP:ksi ja diakvaplatinakompleksiksi, jonka todettiin vaikuttavan luukasvaimeen. DEBP-Pt:n todettiin kuitenkin olevan tarpeeksi stabiili, jotta sitä voitaisiin annostella suonensisäisesti. Yhdiste osoitti myös nopeampaa adsorptiota hydroksiapatiittia kohtaan kuin pelkkä sisplatiini. Kaikista tutkituista Pt-komplekseista, DEBP-Pt osoitti suurinta affiniteettia hydroksiapatiittia kohtaan, kun sitä mitattiin ihmisen veriseerumissa *in vivo*. DEBP-Pt:n todettiin myös omaavan suuremman inhibointiefektin luun resorptiota

kohtaan kuin pelkkä sisplatiini. Tulevaisuudessa tästä kompleksista voitaisiin saada lääke luukasvaimen etäpesäkkeitä vastaan.

9 Yhteenveto

Bisfosfonaatteja on tutkittu jo 1800-luvulta lähtien. Niitä on käytetty esim. pesuaineiden lisäaineina ja vesien kalsiumkarbonaattisaostumien poistamiseen. Bisfosfonaatit ovat erittäin vesiliukoisia ja siksi ne aiheuttavatkin erittäin ikäviä sivuvaikutuksia suun kautta nautittuna. Suun kautta annosteltavien bisfosfonaattien biosaatavuus on yleisesti alle 1 %.

Rakenteeltaan bisfosfonaatit ovat pyrofosfaatin kaltaisia. Niissä on kaksi fosfonaattiryhmää yhdistettynä toisiinsa yhden hiiliatomin välityksellä, mikä tekee bisfosfonaattien rakenteesta pyrofosfaatteja kestävämmän. Pyrofosfaateilla fosfaattiryhmät ovat yhdistettynä toisiinsa happiatomin välityksellä, eikä niiden rakenne ole yhtä kestävä. Fosfonaattiryhmissä on neljä hapanta protonia. Keskushiilen mahdollisessa hydroksyyli ryhmässä oleva protoni on erittäin heikosti hapan.

Bisfosfonaatteja käytetään muiden käyttötarkoitustensa lisäksi lääkeaineina tuki- ja liikuntaelinsairauksien hoidossa. Niillä hoidetaan mm. osteoporoosia, Pagetin tautia, erilaisia luutumisongelmia sekä estetään syövän luumetastaasien syntyä. Hammaslääketieteessä bisfosfonaatteja on käytetty hammaskiilteen ja -luun etsaamiseen. Bisfosfonaattien kaksi- tai kolmihampainen sitoutuminen metallikationeihin on voimakasta. Tällä tavoin bisfosfonaatti kiinnittyy myös luuhun.

Huonon imeytymisen lisäksi bisfosfonaattien huonoja puolia ovat ikävät sivuvaikutukset. Suun kautta nautittavien bisfosfonaattien yleisimmät haittavaikutukset ovat ruoansulatuskanavan ongelmat. Kaikki bisfosfonaatit voivat aiheuttaa vakavia ja jopa työkyvyn vieviä luu-, nivel- tai muskuloskeletaalikipuja. Nämä kivut ilmenevät yleensä jossain vaiheessa bisfosfonaattihoidon jälkeen. Haittavaikutukset ovat harvinaisia ja bisfosfonaattien hyödyt ylittävät moninkertaisesti niihin liittyvät riskit.

Bisfosfonaatit jaetaan yleisesti kolmeen ryhmään: ensimmäisen, toisen ja kolmannen sukupolven bisfosfonaatteihin. Ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatit eivät sisällä typpiä kuten toisen ja kolmannen sukupolven bisfosfonaatit. Ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatit vaikuttavat estämällä osteoklastien toimintaa aiheuttamalla niille solukuoleman. Typeä sisältävät bisfosfonaatit puolestaan vaikuttavat estämällä farnesyylipyrofosfaattisyntaasientsyymien toimintaa. Tämä entsyymi on vastuussa mevalonihapon metaboliasta.

Bisfosfonaatteja voidaan valmistaa useilla eri menetelmillä. 1-Hydroksibisfosfonihappoja voidaan pääasiassa valmistaa kahdella eri synteessireitillä karboksyylihapoista tai aminohapoista. Suora synteessireitti perustuu kondensaatioreaktioon. Siinä karboksyylihapo reagoi fosforihapon ja fosforitri-, fosforipenta- tai fosforioksidikloridin seoksen kanssa, minkä jälkeen reaktio sammutetaan vedellä tai suolahapolla. Toinen, epäsuora synteessireitti perustuu Michaelis-Arbuzovin reaktioon, jossa esim. happokloridi reagoi trialkyylifosfiitin kanssa muodostaen α -ketofosfonaatin. Toisessa vaiheessa α -ketofosfonaattiin liitetään dialkyylifosfiitti, minkä seurauksena saadaan 1-hydroksi-1,1-bisfosfonaatti. 1-Hydroksi-1,1-bisfosfonihappojen tetraesterit voivat uudelleenjärjestäytyä lämmityksen tai emästen vaikutuksesta.

Bisfosfonihappoja voidaan valmistaa myös amiineista ja amideista. Amiinista muodostetaan esimerkiksi formamidi muurahaishapon avulla. Tämä reagoi sitten veden ja fosforitrikloridin kanssa muodostaen aminometyleenibisfosfonihapon. Reaktiot tapahtuvat helpommin primäärisillä kuin sekundäärisillä amiineilla, kun taas tertiäärisillä reaktiota ei tapahdu steerisen esteen takia lainkaan. Amideista valmistetaan bisfosfonihappoja esim. fosforihapon ja fosforitrikloridin avulla. Lyhyemmällä lämmityksellä tuotteeksi saadaan bisfosfonihappo ja pidemmällä lämmityksellä dianhydridi. Dianhydridi hydrolysoituu miedosti happamissa olosuhteissa monosykliseen muotoon.

Nitriileistä bisfosfonihappoja voidaan valmistaa edellä mainittuja edullisemmin ja reagenssit ovat helpommin saatavilla. Metaanisulfonihappo reagoi haluttua bisfosfonihappoa vastaavan nitriilin kanssa, minkä jälkeen reaktioseokseen lisätään fosforitrikloridia.

Imiinejä voidaan käyttää *N*-substituoitujen aminobisfosfonaattien valmistukseen. Trimetyylifosfiitin kanssa ne muodostavat reaktiotuotteeksi 1,1-bisfosfonaatin metyyliesterijohdannaisen. Joitain ei-typpeä sisältäviä bisfosfonaatteja on onnistuttu valmistamaan otsonolyysin avulla bisfosfonaateista. Typpeä sisältäviä alkyyli- tai heterosyklisbifosfonaatteja voidaan valmistaa jopa 20 minuutissa mikroaltojen avulla. Mikroallosynteesissä voidaan myös käyttää myrkyttömämpää ja ympäristöystävällisempää liuotinta, sulfolaania.

Bisfosfonaateista voidaan valmistaa erilaisia aihiolääkkeitä. Kun bisfosfonaatteja muokataan rasvaliukoisemmiksi, niiden imeytyminen ja turvallisuus paranevat.

Bisfosfonaattien aihiolääkkeitä voidaan valmistaa joko esteröimällä bisfosfonaatin happoryhmä tai muokkaamalla joko amino- tai hydroksyyli-ryhmää. Aihiolääkkeitä voidaan valmistaa myös liittämällä bisfosfonaattiin jokin molekyyli tai lääkeaine. Tällöin molekyyli tai lääkeaine voi parantaa bisfosfonaatin imeytymistä ja/tai bisfosfonaatti voi parantaa molekyylin tai lääkeaineen imeytymistä. Lääkeaine-bisfosfonaattijohdannaisilla voidaan varmistaa lääkeaineiden vaikutus hyödyntämällä niitä bisfosfonaattien ominaisuuksia, joilla ne hakeutuvat kohti luuta.

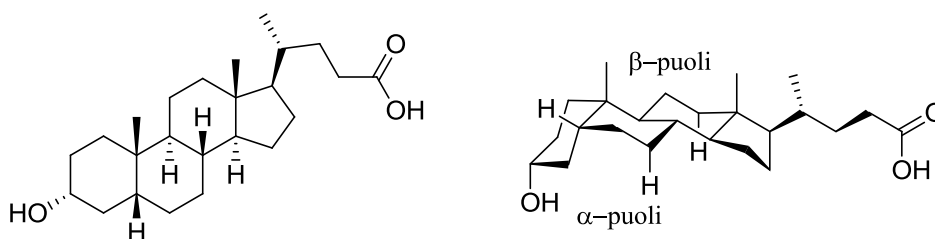
KOKEELLINEN OSA

Bisfosfonaatti-sappihappojohdannaisten valmistus bisfosfonaattien oraalisen biosaatavuuden parantamiseksi

10 Työn tarkoitus

Erikoistyöni "Bisfosfonaatti-sappihappojohdannaisien valmistus bisfosfonaattien oraalisen biosaatavuuden parantamiseksi" tarkoituksena oli valmistaa sarja sappihappojen sekä erään bisfosfonaatin, alendronaatin johdannaisia. Bisfosfonaatit ovat luusairauksien hoidossa käytettäviä lääkeaineita. Ne ovat vesiliukoisia, minkä vuoksi niiden imeytyminen on huonoa ja biosaatavuus heikko, esimerkiksi vain 0,75 % alendronaatista imeytyy suun kautta otettuna. Ne aiheuttavat usein myös ikäviä sivuvaikutuksia, kuten pahoinvointia.

Sappihapot ovat steroidirakenteisia karboksyylihappoja, jotka maksa valmistaa kolesterolista (Kuva 67).



Kuva 67. Litokoolihappo.

Sappihapoissa on sekä hydroksyyliyhmiin aiheuttama hydrofiilinen α -puoli että kurvikkaan profiilin ja metyyliyhmiin aiheuttama hydrofobinen β -puoli. Sappihappoja voidaan muokata monin eri tavoin, kuten esteröimällä, pelkistämällä tai amidoimalla funktionaaliset ryhmät tai muuttamalla karboksyyliyhmiinoryhmä suolamuotoon. Konjugoimalla bisfosfonaatteja sappihappojen kanssa saadaan aikaan rasvaliukoisempi bisfosfonaattijohdannainen, minkä uskotaan tekevän siitä paremmin imeytyvän.^{105, 106}

Tässä erikoistyössä pyrittiin syntetisoimaan alendronaatin sappihappokonjugaatteja. Synteesissä alendronaatin typpi-atomiin liitettiin amidisidoksella sappihapon anhydridijohdannainen.

11 Kokeellinen osa

11.1 Menetelmät ja laitteet

Kaikista synteesisuotteista on ajettu ^{31}P - ja ^1H NMR-spektrit Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker AV 300 FT NMR -spektrometrillä. Joistakin tuotteista on lisäksi ajettu ^{13}C NMR-spektrit Bruker AV 400 tai Bruker Avance DRX 500 NMR-spektrometreillä. Massaspektrit on mitattu Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Micromass LCT ESI-TOF -massaspektrometrillä.

11.2 Käytetyt reagenssit ja liuottimet

Seuraavassa taulukossa (taulukko 2) esitetään synteeseissä käytetyt reagenssit.

Taulukko 2. Käytetyt reagenssit ja liuottimet sekä niiden valmistajat ja puhtausasteet

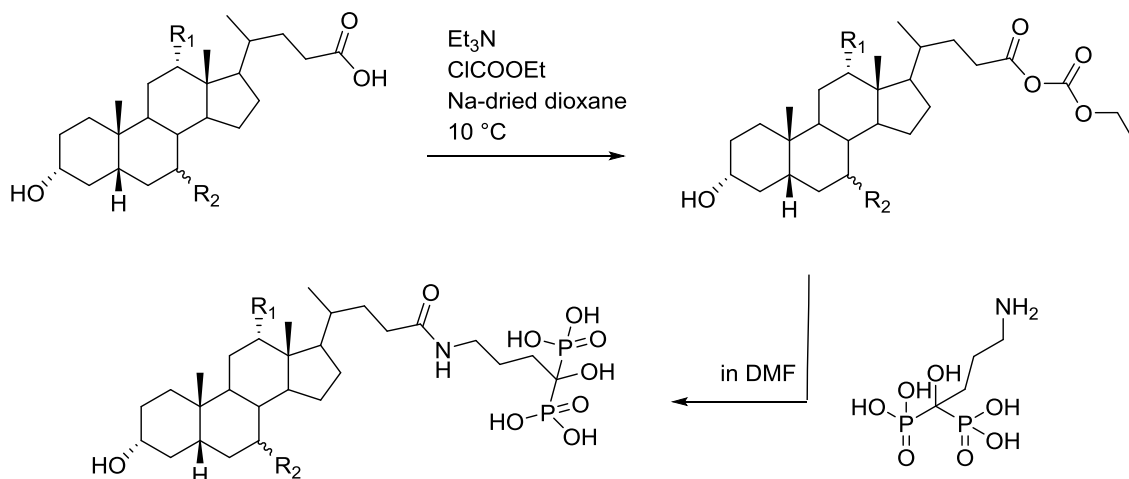
Reagenssi	Valmistaja	Puhtausaste %
1,4-dioksaani	VWR Chemicals	99,6
Alendronihappo	(valmiina)	
Dehydrokoolihappo	Fluka	>99
Dietyylieetteri	Sigma-Aldrich	$\geq 99,8$
Dikloorimetaani	Sigma-Aldrich	$\geq 99,9$
Dimetyyliformamidi	VWR Chemicals	100,0
Etidronihappo	(valmiina)	
Etyyliklooriformiaatti	Merck	97
Kloroformi	VWR Chemicals	99
Koolihappo	Acros organics	97
Litokoolihappo	Sigma	≥ 95
Natriumhydroksidi	Sigma-Aldrich	≥ 98
Natriumkloridi	Sigma-Aldrich	$\geq 99,0$
Natriumsulfaatti	Sigma-Aldrich	$\geq 99,0$
Tetrakloorimetaani	Sigma-Aldrich	
Tionyylikloridi	Riedel	>98
Trietyyliamiini	Sigma-Aldrich	
Ursodeoksikoolihappo	Sigma-Aldrich	min. 99
Vetykloridihappo	J.T. Baker	37-38

11.3 Synteetit

Seuraavassa luvussa esitetään erikoistyössä tehdyt synteetit pääpiirteittäin. Synteesiohjeet esitetään kappaleessa 14.

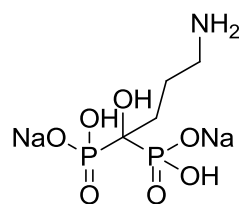
11.3.1 Alendronaatin sappihappojohdannaiset

Sappihappo-alendronihappojohdannaisia pyrittiin valmistamaan käyttäen kirjallisuudesta tuttua synteesimenetelmää¹⁰⁷, jossa sappihapon karboksyylihapporyhmä aktivoidaan ja liitetään sitten vapaaseen aminoryhmään amidisidoksella (Kuva 68). Litokoolihappo aktivoitiin muokkaamalla se anhydridimuotoon. Ensimmäisellä synteesikerralla alendronihappo oli happomuodossa, minkä vuoksi se ei liennut DMF:iin. Tästä johtuen reaktio ei toiminut toivotulla tavalla eikä haluttua tuotetta syntynyt.



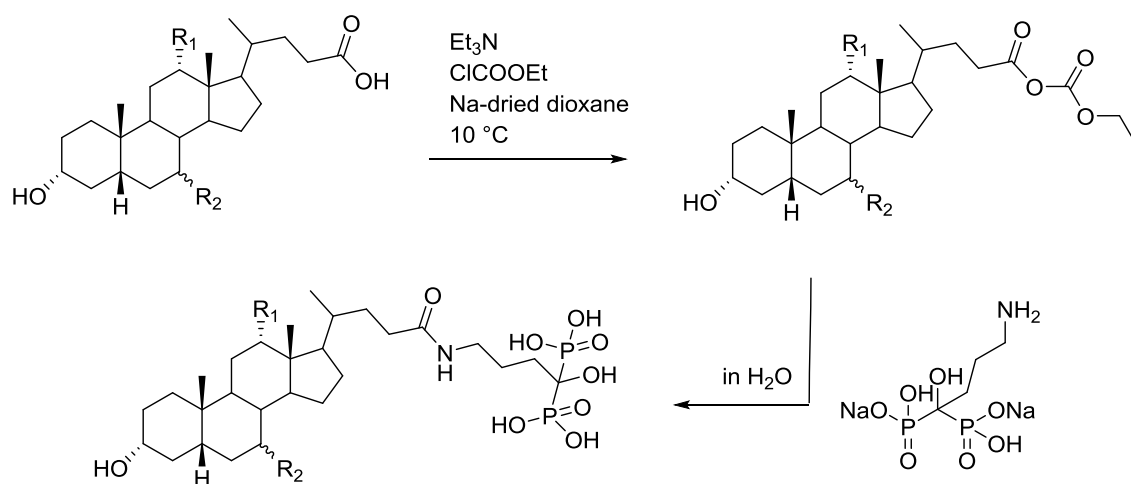
Kuva 68. Sappihappo-alendronihappojohdannaisen valmistus, menetelmä 1.

Seuraavaksi alendronihappo muutettiin kahtaisionikseen^{68, 108}, jolloin sen aminoryhmä oli suojattu elektrofiiliseltä hyökkäykseltä. Alendronihappo tai sen kahtaisioni olivat erittäin niukkaliukoisia, minkä vuoksi alendronihappo pyrittiin muuttamaan liukoisempaan dinatriumsuolamuotoonsa (Kuva 69).



Kuva 69. Alendronaatti, alendronihapon dinatriumsuola.

Alendronihapon dinatriumsuola lisättiin sitten aktivoituneen sappihapon sisältävään liuokseen (Kuva 70).



Kuva 70. Alendronihappo-sappihappojohdannaisen valmistus, menetelmä 2.

Reaktion etenemistä seurattiin NMR-spektroskopian avulla. NMR-spektreissä pyrittiin havainnoimaan muodostuvan amidisidoksen protonisignaalia. Koska amidiprotoni on labiili, sitä ei välttämättä havaita NMR-spektrissä. Siksi tuotteen muodostuminen varmistettiin massaspektrometrialla.

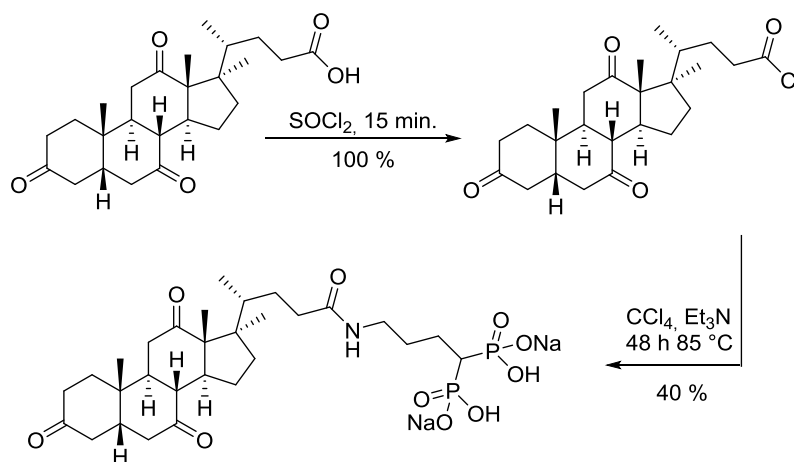
Kolmannella synteesikerralla alendronihappo muutettiin dinatriumsuolamuotoonsa lisäämällä alendronihapon vesiliuoksen sekaan 40 % NaOH-liuosta ja sekoittamalla vesiliuosta jäähauteessa vain siihen saakka, kun liuos oli kirkas.¹⁰⁸ Vesiliuos lisättiin sitten aktivoituneen sappihapon joukkoon. Lopuksi tuote puhdistettiin H^+ -muotoisen ioninvaihtohartsin kanssa sekoittamalla (Kuva 71), jolloin lähtöaine alkoi hajoamaan ja tuotteen saantoprosentti jäi vähäiseksi.



Kuva 71. Reaktiotuotteen puhdistus ioninvaihtohartsia käyttäen.

11.3.2 Etidronaatin sappihappojohdannaiset

Sappihappo pyrittiin aktivoimaan valmistamalla siitä happokloridi^{107, 109}, jonka annettiin reagoida etidronihapon Na-suolan kanssa (Kuva 72). Etidronihapon Na-suola valmistettiin sekoittamalla sitä Na^+ -aktivoidun ioninvaihtohartsin kanssa. Reaktio ei onnistunut, minkä vuoksi sappihappojen etidronaattikonjugaattien valmistuksesta luovuttiin.



Kuva 72. Etidronihappo-sappihappojohdannaisen valmistus.

12 Tulokset ja niiden tarkastelu

12.1 Alendronaatin litokoolihappokonjugaatti

Ensimmäisellä synteesikerralla alendronihappo liuotettiin DMF:iin, johon se ei kuitenkaan liuennut. Toisella synteesikerralla alendronihappo liuotettiin 50 ml:aan vettä, minkä jälkeen seoksen pH säädettiin arvoon 4. Alendronaattiliuoksen annettiin sekoittua jäähauteessa 0-5 °C:ssa kaksi tuntia. Sillä aikaa litokoolihappo muutettiin anhydridimuotoon. Litokoolihappo liuotettiin Na-kuivattuun 1,4-dioksaaniin. Lämpötilan annettiin laskea +10 °C:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin ensin trietyyliamiini ja sen jälkeen etyliklooriformiaatti Na-kuivatussa 1,4-dioksaanissa. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä 30 minuutin ajan. Alendronaatin vesiliuokseen lisättiin 40 % NaOH-liuosta, minkä jälkeen saatu seos lisättiin litokoolihapon anhydridin sisältävän liuoksen sekaan. Saatua seosta sekoitettiin +80 °C:ssa neljä vuorokautta, jolloin reaktioseos muuttui kirkkaasta samean vaaleaksi. Tämän jälkeen liuottimet haihdutettiin pois ja raakatuotetta uutettiin dietyylieetterillä. Saatu liete suodatettiin ja sakkaa sekoitettiin 30 min etanolissa reagoimattoman litokoolihapon poistamiseksi. Sen jälkeen reaktioseos suodatettiin, sakka liuotettiin veteen ja saatua liuosta sekoitettiin H⁺-muotoisen ioninvaihtohartsin kanssa reagoimattoman alendronaatin poistamiseksi. Vesi haihdutettiin tämän jälkeen pois ja jäännös liuotettiin kuumaan etanoliin. Suodatettiin reaktioseos ja karakterisoitiin haihdutettu suodos ³¹P ja ¹H NMR- sekä massaspektrometrialla.

Litokoolihapon alendronaattijohdannaisen ¹H NMR-spektrissä (Liite 1-1) havaittiin sekä alendronaatille että litokoolihapolle ominaisia signaaleja. Sen perusteella ei kuitenkaan voitu varmistaa reaktion onnistumista, koska amidiprotonin signaalia ei havaittu. Koska ³¹P NMR-spektrissä (Liite 1-2) havaittiin alendronaatin fosforisignaalista (δ=20 ppm) poikkeava signaali kemiallisen siirtymän arvolla δ=21 ppm, pääteltiin kyseessä olevan jokin alendronaatin johdannainen. Kun lisäksi ¹³C NMR-spektrissä (Liite 1-3) havaittiin karbonyylisignaali sappihappoamidille tyypillisellä kemiallisen siirtymän arvolla (δ=174 ppm), pääteltiin reaktiotuotteena syntyneen litokoolihapon ja Na-alendronaatin amidia. Sappihappojen esterien karbonyylisiirtymä esiintyy tyypillisesti kemiallisen siirtymän arvolla 176 ppm ja karboksyylihappojen siirtymä arvolla 178 ppm. Massaspekttrissä (Liite 1-4) havaittiin litokoolihapon ja Na-alendronaatin konjugaatin [M-H]⁻ -signaali m/z-arvolla 606,2.

Tämän perusteella ei kuitenkaan voida sanoa, onko kyseessä amidi- vai esterijohdannainen, sillä molempien tuotteiden moolimassat ovat täsmälleen samat.

12.2 Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti

Dehydrokoolihappo muutettiin reaktiivisempaan anhydridimuotoonsa liuottamalla se ensin Na-kuivattuun 1,4-dioksaaniin ja antamalla lämpötilan laskea +10 °C:seen. Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin ensin trietyyliamiini ja sitten etyyliklooriformiaatti Na-kuivatussa 1,4-dioksaanissa. Reaktioseoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 minuuttia. Samaan aikaan dinatriumalendronaatti liuotettiin 10 ml:aan vettä ja saatua seosta sekoitettiin jäähähteessä niin kauan, että liuos muuttui täysin kirrkaaksi. Tämän jälkeen vesiliuoksen sekaan lisättiin 40% NaOH-liuosta. Saatu alendronaatin vesiliuos lisättiin dehydrokoolihappoanhydridiliuoksen sekaan ja annettiin sekoittua +80 °C:ssa 48 h. Tämän jälkeen reaktioseoksen käsittelyä jatkettiin kuten edellä, kuitenkin sillä erotuksella, että alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatin tapauksessa reagoimaton sappihappo pestiin pois kloroformin avulla. Ioninvaihtohartsikäsittely suoritettiin kuusi kertaa ennen kuin kaikki vapaa alendronaatti saatiin pois. Lopulta suodoksesta haihdutettiin vesi pois ja tuote karakterisoitiin ^{31}P ja ^1H NMR-spektrien sekä massaspektrometrian avulla.

Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatin ^1H NMR-spektrissä (Liite 2-1) havaittiin sekä dehydrokoolihapolle että alendronaatille ominaisia signaaleja. Sen perusteella ei kuitenkaan voitu varmistaa reaktion onnistumista, koska amidiprotonin signaalia ei havaittu. Koska ^{31}P NMR-spektrissä (Liite 2-2) havaittiin alendronaatin fosforisignaalia ($\delta=19$ ppm) poikkeava signaali kemiallisen siirtymän arvolla $\delta=20$ ppm, pääteltiin kyseessä olevan jokin alendronaatin johdannainen. Massaspekttrissä (Liite 2-1) havaittiin dehydrokoolihapon ja Na-alendronaatin konjugaatin $[\text{M-H}]^-$ -signaali m/z -arvolla 632,5. Tämän perusteella ei kuitenkaan voitu päätellä, oliko reaktiossa syntynyt dehydrokoolihapon ja alendronaatin amidi vai esteri. Alendronaatin dehydrokoolihappojohdannaisesta ei saatu mitattua ^{13}C NMR-spektriä, sillä tuote oli erittäin niukkaliukoinen.

12.3 Alendronaatin koolihappokonjugaatti

Koolihappo muutettiin reaktiivisempaan anhydridimuotoonsa liuottamalla se ensin Na-kuivattuun 1,4-dioksaaniin ja antamalla lämpötilan laskea +10 °C:seen. Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin ensin trietyyliamiini ja sitten etyyliklooriformiaatti Na-kuivatussa 1,4-dioksaanissa. Reaktioseoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 minuuttia. Dinatriumalendronaatti liuotettiin 10 ml:aan vettä ja saatua seosta sekoitettiin jäähauteessa niin kauan, että liuos muuttui täysin kirkkaaksi. Tämän jälkeen vesiliuoksen sekaan lisättiin 40 % NaOH-liuosta. Saatua dinatriumalendronaatin vesiliuos lisättiin koolihappoanhydridiliuoksen sekaan ja annettiin sekoittua +80 °C:ssa 72 h. Reagoimaton koolihappo poistettiin etanolin avulla. Ioninvaihtohartsikäsittelyn jälkeen vesi suodatettiin pois, jolloin reaktioseos jäi kolvin reunoille pihkamaiseksi aineeksi. CHCl₃- ja CCl₄-liuotinten seoksella saatiin reaktiotuote saostumaan vaaleina kiteinä. Ioninvaihtohartsikäsittely suoritettiin vielä viisi kertaa, ennen kuin kaikki vapaa alendronaatti saatiin pois. Valitettavasti reaktiotuotetta ei kuitenkaan jäänyt juuri jäljelle. ³¹P NMR-spektroskopian perusteella tuotteen muodostuminen reaktion aikana voitiin varmistaa spektrissä havaitun alendronihapon kemiallisesta siirtymästä poikkeavan ³¹P-signaalin (δ= 20 ppm) avulla.

Synteesiä yritettiin toistaa käyttäen koolihappoylimäärää. Reaktiota ei kuitenkaan tällöin tapahtunut lainkaan. Lopputuotteen määrää pyrittiin kasvattamaan myös käyttämällä kaksinkertaisia ainemääriä. Tällöin reaktioseoksen annettiin sekoittua jopa 140 h, mutta reaktio ei ollut edennyt enää vuorokauden jälkeen. Raakatuotetta pestiin etanolilla reagoimattoman koolihapon poistamiseksi, minkä jälkeen jäännös liuotettiin veteen ja sekoitettiin H⁺-muotoisen ioninvaihtohartsin kanssa 45 minuuttia. Vesi haihdutettiin pois ja mitattiin ³¹P NMR-spektri. Spektrin perusteella todettiin, että mahdollisesti muodostuneen tuotteen määrä oli erittäin pieni ja että dinatriumalendronaatti oli hajonnut käsittelyjen aikana.

Synteesi suoritettiin vielä liuottamalla happomuotoinen alendronihappo 2 ml:aan vettä. Tähän vesiliuokseen lisättiin sitten kuusi ekvivalenttia 40 % NaOH-liuosta, jotta alendronihappo saataisiin Na-suolakseen. Saatua suolaa käytettiin reaktiossa. Koolihappo muutettiin reaktiivisempaan anhydridimuotoonsa kuten aiemmin. Reaktioseoksen annettiin sekoittua ensin 55 °C:ssa 15 minuuttia, minkä jälkeen kolvissa havaittiin pihkamaista ainetta ja kirkasta liuosta. Lämpötila nostettiin +80 °C:seen ja

annettiin sekoittua 46 h. Reaktioseos suodatettiin, minkä jälkeen sakkaa uutettiin dietyylieetterillä. Reaktioseos muuttui erittäin tahmeaksi, eikä sitä saatu tämän jälkeen enää suodatettua. Dietyylieetteri haihdutettiin pois ja raakatuote liuotettiin veteen. Sen jälkeen vesiliuos käsiteltiin H⁺-muotoisen ioninvaihtohartsin avulla. Vesi haihdutettiin pois. Jäännöstä ei saatu karakterisoitua, sillä se ei liennut yleisimpiin NMR-liuottimiin.

12.4 Alendronaatin ursodeoksikoolihappokonjugaatti

Ursodeoksikoolihappo muutettiin reaktiivisempaan anhydridimuotoonsa kuten edellä. Reaktioseoksen käsittelyä jatkettiin kuten aiemmin, mutta tätä reaktioseosta sekoitettiin +80 °C:ssa 48 h. Reagoimaton ursodeoksikoolihappo pestiin pois etanolin avulla. Jäännös liuotettiin veteen ja reagoimaton alendronaatti poistettiin ioninvaihtohartsikäsitellyllä, joka toistettiin yhteensä kuusi kertaa. Tuotetta ei juuri jäänyt jäljelle. ³¹P NMR-spektroskopian perusteella tuotteen muodostuminen reaktion aikana voitiin varmistaa spektrissä havaitun alendronihapon kemiallisesta siirtymästä poikkeavan ³¹P-signaalin (δ= 20 ppm) avulla.

12.5 Alendronaatin deoksikoolihappokonjugaatti

Deoksikoolihappo muutettiin reaktiivisempaan anhydridimuotoonsa kuten edellä. Reaktioseoksen käsittelyä jatkettiin kuten aiemmin, mutta tässä tapauksessa reaktioseosta sekoitettiin 44 h. Reaktio oli kuitenkin NMR-spektriin perusteella edennyt loppuun jo alle vuorokaudessa, jopa kahdessa tunnissa. Reagoimaton deoksikoolihappo poistettiin etanolin avulla. Jäännös liuotettiin veteen ja reagoimaton alendronaatti poistettiin 30 minuutin ioninvaihtohartsikäsitellyllä. Vesi haihdutettiin pois ja tuotteesta mitattiin ³¹P NMR-spektri. ³¹P NMR-spektroskopian perusteella tuotteen muodostuminen reaktion aikana voitiin varmistaa spektrissä havaitun alendronihapon kemiallisesta siirtymästä poikkeavan ³¹P-signaalin (δ= 20 ppm) avulla.

12.6 Etidronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti

Etidronihappo muutettiin suolamuotoonsa käyttäen Na⁺-muotoista ioninvaihtohartsia. Dehydrokoolihaposta valmistettiin reaktiivisempi happokloridi SOCl₂:a käyttäen.

Dehydrokoolihappoa ja tionyylikloridylimäärää sekoitettiin 15 minuuttia, minkä jälkeen tionyylikloridylimäärä tislattiin pois. Jäännös liuotettiin CCl_4 :iin ja liuotin haihdutettiin pois. Jäännös liuotettiin uudelleen CCl_4 :iin, minkä jälkeen seokseen lisättiin Na-etidronaatti ja trietyyliamiini. Reaktioseosta sekoitettiin $+85\text{ }^\circ\text{C}$:ssa 113 h. Haihdutettiin liuottimet pois ja jäännökseen lisättiin 30 ml CHCl_3 :a. Orgaanista kerrosta pestiin 2 M HCl:lla, mutta orgaanista kerrosta ja vesikerrosta ei saatu erottumaan.

Sakka suodatettiin ja liuotettiin eetteriin. Eetterikerrosta yritettiin jälleen pestä 2 M suolahapolla, vedellä ja kylläisellä NaHCO_3 -liuoksella, mutta emäspesun jälkeen orgaanista ja vesikerrosta ei saatu erottumaan. Sakka suodatettiin. NMR-spektrien perusteella tuotetta ei ollut syntynyt.

13 Yhteenveto

Erikoistyön tarkoituksena oli syntetisoida alendronaatin sappihappokonjugaatteja, joissa sappihappo liitettäisiin alendronaatin aminoryhmään amidisidoksella. Sappihapot muokattiin ensin reaktiivisempaan anhydridimuotoon, mikä onnistui varsin vaivattomasti. Tämän jälkeen anhydridin annettiin reagoida alendronaatin kanssa. Valitettavasti tuotteiden saantoprosentit jäivät mataliksi.

Sappihappojen hydroksyyliyhymien lukumäärä saattaa vaikuttaa niiden reaktiivisuuksiin. Onnistuneissa synteeseissä lähtöaineina käytettiin ei yhtään tai yhden hydroksyyliyhymän sisältäviä sappihappoja, epäonnistuneissa synteeseissä lähtöaineina käytetyissä sappihapoissa hydroksyyliyhymiä oli puolestaan useita. Ne vaikuttavat myös sappihappojen liukoisuuksiin, mikä puolestaan voi vaikuttaa reaktioiden kulkuun.

Koska alendronaatti on hyvin niukkaliukoinen muihin kuin vesiliuoksiin, jouduttiin se lisäämään sappihapon anhydridiliuokseen vesiliuoksenaan. Reaktiivinen anhydridi on tällöin saattanut hajota takaisin vähemmän aktiiviseen happomuotoonsa.

Työn tarkoituksena olleen alendronaatin sappihappokonjugaattien valmistuksen voidaan todeta onnistuneen, joskin saannot jäivät vähäisiksi. Mitatut spektrit tukivat johtopäätöstä, jonka mukaan synteetit tuottivat haluttuja tuotteita. NMR-spektroskopian ja massaspektrometrian perusteella ei valitettavasti voida sanoa, oliko haluttu konjugaatti lähtöaineiden amidi vai esteri. Se jää selvitetäväksi muita menetelmiä käyttäen.

Projekti osoittautui haastavaksi, mutta mielenkiintoiseksi. Synteesimenetelmiä kehitetään jatkossa. Myös niiden tuloksena saatavien sappihappojen bisfosfonaattikonjugaattien käyttöä aihiolääkkeinä bisfosfonaattien oraalisen biosaatavuuden parantamiseksi tullaan tutkimaan. Työskentelyä motivoi, kun sai työskennellä kannustavassa ja asiantuntevassa ohjauksessa. Spektroskooppisten analyysilaitteiden monipuolinen käyttö toi myös itsevarmuutta niiden käyttöön tulevaisuudessa.

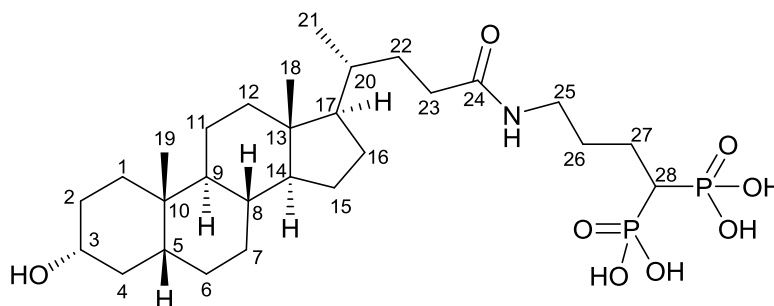
14 Synteesiohjeet

Kuvissa 73 ja 74 on kuvattu alendronaatin litokoolihappokonjugaatin (Kuva 73) ja alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatin (Kuva 74) rakenteet.

14.1 Alendronaatin litokoolihappokonjugaatti

Alendronihappo (0,4025 g, 1,616 mmol) liuotettiin n. 50 ml:aan vettä ja seos jäädytettiin huoneenlämpöön. Liuoksen pH säädettiin 40 % NaOH-liuoksella arvoon 4 ja annettiin sekoittua 0-5 °C:ssa 2 tuntia. Litokoolihapon (0,4541 g, 1,206 mmol) ja Na-kuivatun 1,4-dioksaanin (30 ml) seos jäädytettiin +10 °C:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin vastatislattu trietyyliamiini (0,225 ml, 1,616 mmol) ja sen jälkeen vastatislattu etyliklooriformiaatti (0,154 ml, 1,616 mmol) 3 ml:ssa Na-kuivaa 1,4-dioksaania. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 minuuttia. Kun alendronaatin vesiliuos oli sekoittunut kaksi tuntia, lisättiin sen joukkoon 1 eq (0,162 µl, 1,616 mmol) 40 % NaOH-liuosta. Alendronaattiliuos lisättiin litokoolihapon anhydridin joukkoon, ja syntynyttä seosta sekoitettiin +80 °C:ssa 96 h.

Liuottimet haihdutettiin pois ja jäännökseen lisättiin 15 ml dietyylieetteriä, minkä jälkeen sakka suodatettiin. Sakkaa sekoitettiin absoluuttisessa etanolissa 30 min. Sakka liuotettiin veteen ja liuos käsiteltiin H⁺-muotoista ionihartsia käyttäen. Vesi haihdutettiin pois ja jäännöstä sekoitettiin kuumassa etanolissa. Liuottimet haihdutettiin pois suodattamisen jälkeen.



Kuva 73. Alendronaatin litokoolihappokonjugaatin rakenne.

$M(C_{28}H_{51}NO_9P_2) = 607,65 \text{ g/mol}$

Teorettinen saanto: 0,7328 g

Saanto: 0,052 g = 7,10 %

^1H NMR (MeOD- d_4 , 300 MHz): 3.27 (overlapping, 4H ($2\text{H}_{\text{BA}} + 2\text{H}_{\text{ALE}}$)), 2.35 – 1.45 (overlapping 26 H ($22\text{H}_{\text{BA}} + 4\text{H}_{\text{ALE}}$)), 1.33 (s, 3H), 1.16 (s, 2H), 1.03 (s, 3H_{21}), 1.01 (s, 3H_{19}), 0.92 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 0.75 (s, 3H_{18}).

^{13}C NMR (MeOD- d_4 , 126 MHz): δ 174.29, 70.10, 57.57 – 51.56 (overlapping), 51.43, 41.86 – 36.13 (overlapping), 35.84 – 18.31 (overlapping), 16.51, 10.07, 6.80.

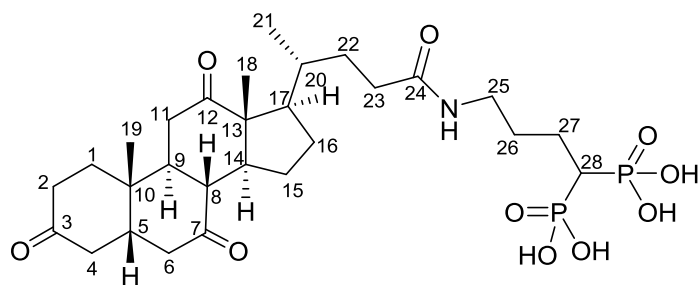
^{31}P NMR (MeOD, 121 MHz): δ 21.41

MS(ESI-TOF) m/z: $[\text{M}-\text{H}]^- = 606,2402$

14.2 Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatti

Dehydrokoolihapon (1,0064 g, 2,5 mmol) ja Na-kuivan 1,4-dioksaanin (30 ml) seos jäädytettiin +10 °C:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin vastatislattu trietyyliamiini (0,467 ml, 3,35 mmol) ja sen jälkeen vastatislattu etyliklooriformiaatti (0,319 ml, 3,35 mmol) 3 ml:ssa Na-kuivaa 1,4-dioksaania. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 min. Samaan aikaan dinatriumalendronaatti (0,9836 g, 3,35 mmol) liuotettiin 10 ml:aan ionivaihdettua vettä. Seosta sekoitettiin jäähauhteessa niin kauan, kunnes liuos muuttui kirkkaaksi. Sen jälkeen vesiliuokseen lisättiin 1 eq (0,390 ml, 3,35 mmol) 40 % NaOH-liuosta. Alendronaattiliuos lisättiin dehydrokoolihappoanhydridin sisältävän liuoksen joukkoon ja reaktioseosta sekoitettiin +80 °C:ssa 48 h.

Liuottimet haihdutettiin pois ja jäännökseen lisättiin 15 ml dietyylieetteriä, minkä jälkeen sakka suodatettiin. Sakkaa sekoitettiin absoluuttisessa etanolissa 30 min. Suodatuksen jälkeen sakan sisältäneeseen astiaan lisättiin 20 ml kloroformia. Liuoksen annettiin sekoittua 20 min, minkä jälkeen sakka suodatettiin ja pestiin 3 x 10 ml kloroformia. Sakka liuotettiin veteen ja käsiteltiin saatua liuosta H^+ -muotoisen ionihartsin kanssa 15 min. Lopuksi vesi haihdutettiin pois reaktioseoksesta ja sakka kuivattiin.



Kuva 74. Alendronaatin dehydrokoolihappokonjugaatin rakenne.

$M(C_{28}H_{45}NO_{11}P_2) = 633,60 \text{ g/mol}$

Teoreettinen saanto: 1,584 g

Saanto: 0,0423 g = 2,67 %

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ 3.42 – 3.17 (overlapping, 5H ($2\text{H}_{\text{ALE}}+3\text{H}_{\text{BA}}$)), 2.60 – 1.82 (overlapping 21 H ($17\text{H}_{\text{BA}} + 4\text{H}_{\text{ALE}}$)), 1.48 (overlapping, 7H ($3\text{H}_{19}+4\text{H}_{\text{ALE}}$)), 1.24 (s, 3H_{18}), 0.90 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H_{21}).

$^{31}\text{P NMR}$ (D_2O , 121 MHz): δ 20.26

MS (ESI-TOF): $[\text{M}-\text{H}]^-$: m/z 632,2386

14.3 Alendronaatin koolihappokonjugaatti

Koolihapon (1,0516 g, 2,5 mmol) ja Na-kuivan 1,4-dioksaanin (30 ml) seos jäähdytettiin $+10 \text{ }^\circ\text{C}$:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin vastatislattu trietyyliamiini (0,467 ml, 3,35 mmol) ja sen jälkeen vastatislattu etyyliklooriformiaatti (0,319 ml, 3,35 mmol) 3 ml:ssa Na-kuivaa 1,4-dioksaania. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 min. Samaan aikaan dinatriumalendronaatti (0,9980 g, 3,35 mmol) liuotettiin 10 ml:aan ionivaihdettua vettä. Seosta sekoitettiin jäähauhteessa niin kauan, kunnes liuos muuttui kirkkaaksi. Sen jälkeen vesiliuokseen lisättiin 1 eq (0,390 ml, 3,35 mmol) 40 % NaOH-liuosta. Alendronaattiliuos lisättiin koolihappoanhydridin sisältävän liuoksen joukkoon ja reaktioseosta sekoitettiin $+80 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa 72 h.

Liuottimet haihdutettiin pois ja jäännökseen lisättiin 15 ml dietyylieetteriä, minkä jälkeen saatu pihkamainen saostuma suodatettiin. Saostumaa sekoitettiin absoluuttisessa etanolissa 30 min. Suodatuksen jälkeen sakka liuotettiin ionivaihdettuun veteen, minkä jälkeen saatua liuosta käsiteltiin H^+ -muotoisella ioninvaihtohartsilla 20 min. Lopuksi vesi haihdutettiin pois reaktioseoksesta ja sakka kuivattiin.

14.4 Alendronaatin ursodeoksikoolihappokonjugaatti

Ursodeoksikoolihapon (0,9982 g, 2,5 mmol) ja Na-kuivan 1,4-dioksaanin (30 ml) seos jäädytettiin +10 °C:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin vastatislattu trietyyliamiini (0,467 ml, 3,35 mmol) ja sen jälkeen vastatislattu etyyliklooriformiaatti (0,319 ml, 3,35 mmol) 3 ml:ssa Na-kuivaa 1,4-dioksaania. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 min. Samaan aikaan dinatriumalendronaatti (0,9935 g, 3,35 mmol) liuotettiin 10 ml:aan ionivaihdettua vettä. Seosta sekoitettiin jäähautessa niin kauan, kunnes liuos muuttui kirkkaaksi. Sen jälkeen vesiliuokseen lisättiin 1 eq (0,390 ml, 3,35 mmol) 40 % NaOH-liuosta. Alendronaattiliuos lisättiin ursodeoksikoolihappoanhydridin sisältävän liuoksen joukkoon ja reaktioseosta sekoitettiin +80 °C:ssa 48 h.

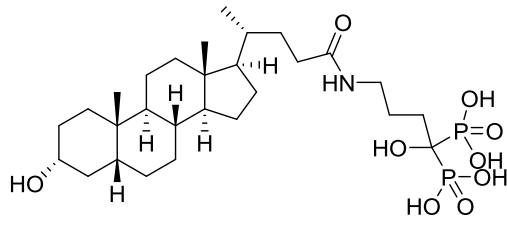
Liuottimet haihdutettiin pois ja jäännökseen lisättiin 15 ml dietyylieetteriä, minkä jälkeen sakka suodatettiin. Sakkaa sekoitettiin absoluuttisessa etanolissa 30 min. Sakka liuotettiin ionivaihdettuun veteen ja liuosta käsiteltiin H⁺-muotoisella ioninvaihtohartsilla 30 min. Lopuksi vesi haihdutettiin pois reaktioseoksesta ja sakka kuivattiin.

14.5 Alendronaatin deoksikoolihappokonjugaatti

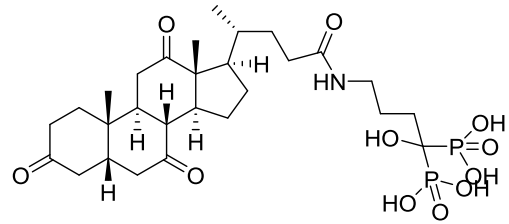
Deoksikoolihapon (1,2704 g, 3,24 mmol) ja Na-kuivan 1,4-dioksaanin (30 ml) seos jäädytettiin +10 °C:seen, minkä jälkeen seokseen lisättiin vastatislattu trietyyliamiini (0,605 ml, 4,34 mmol) ja sen jälkeen vastatislattu etyyliklooriformiaatti (0,413 ml, 4,34 mmol) 3 ml:ssa Na-kuivaa 1,4-dioksaania. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 min. Samaan aikaan dinatriumalendronaatti (1,2708 g, 4,34 mmol) liuotettiin 10 ml:aan ionivaihdettua vettä. Seosta sekoitettiin jäähautessa niin kauan, kunnes liuos muuttui kirkkaaksi. Sen jälkeen vesiliuokseen lisättiin 1 eq (0,496 ml, 4,34 mmol) 40 % NaOH-liuosta. Alendronaattiliuos lisättiin deoksikoolihappoanhydridin sisältävän liuoksen joukkoon, ja reaktioseosta sekoitettiin +80 °C:ssa 44 h.

Liuottimet haihdutettiin pois ja jäännökseen lisättiin 15 ml dietyylieetteriä, minkä jälkeen saatu pihkamainen saostuma suodatettiin. Saostumaa sekoitettiin absoluuttisessa etanolissa 30 min. Saostuma liuotettiin ionivaihdettuun veteen ja saatua liuosta käsiteltiin H⁺-muotoisella ioninvaihtohartsilla 30 min. Lopuksi vesi haihdutettiin pois reaktioseoksesta ja sakka kuivattiin.

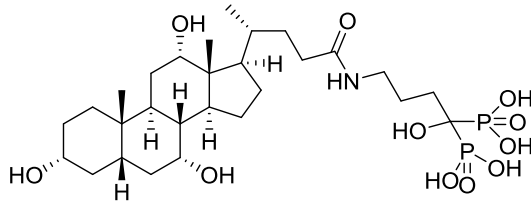
15 Syntetisoidut yhdisteet



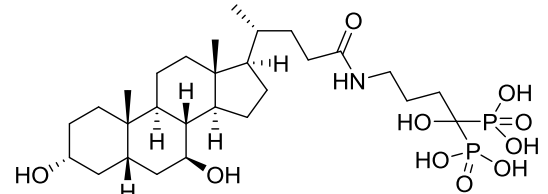
Alendronaatin litokoolihappojohdannainen



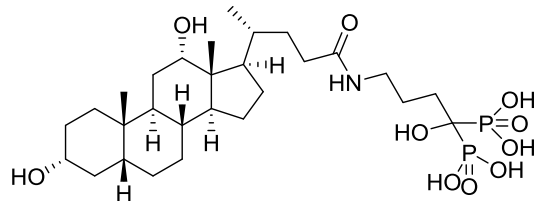
Alendronaatin dehydrokoolihappojohdannainen



Alendronaatin koolihappojohdannainen



Alendronaatin ursodeoksikoolihappojohdannainen



Alendronaatin deoksikoolihappojohdannainen

16 Kirjallisuusluettelo

1. Bisphosphonates, http://www.auburn.edu/~deruija/endo_bisphos.pdf, J. DeRuiter & R. Clark, (21.3.2015).
2. H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient*, 4. Painos, Academic Press, USA, 2000.
3. M.D. Francis & D.J. Valent, Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2007**, 7, 2-8.
4. L.V. Avioli, *The Osteoporotic Syndrome : Detection, Prevention and Treatment*. Kirjassa: N.B. Watts (toim.), *Bisphosphonate Treatment for Osteoporosis*, Academic Press, St. Louis, Missouri, 2000, ss. 121-132.
5. S. Kunnas-Hiltunen, Syntheses, X-ray Diffraction Study and Characterisations of Metal Complexes of Clodronic Acid and Its Symmetrical Dianhydride Derivatives, Väitöskirja, Itä-Suomen yliopisto, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta, Joensuu, **2010**.
6. A-L. Alanne, Novel Applications Related to Bisphosphorus Compounds, Väitöskirja, Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta, **2014**.
7. G.A. Rodan & A.A. Reszka, Bisphosphonate mechanism of action, *Curr. Mol. Med.* **2002**, 2, 571-577.
8. H. Mönkkönen, Intracellular metabolism of bisphosphonates - impact on the molecular mechanism of action and side-effects, Väitöskirja, Kuopion yliopisto, Farmaseuttinen tiedekunta, Kuopio, **2005**.
9. A.K. Nair, A. Gautieri, S-W. Chang & M.J. Buehler, Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone, *Nat Commun.* **2013**, 4, 1724.
10. Decoding the structure of bone, <http://news.mit.edu/2013/decoding-the-structure-of-bone-0416>, Massachusetts University of Technology, (15.9.2015).
11. M. Morioka, A. Kamizono, H. Takikawa, A. Mori, H. Ueno, S-I. Kadowaki, Y. Nakao, K. Kato & K. Umezawa, Design, synthesis, and biological evaluation of novel estradiol-bisphosphonate conjugates as bone-specific estrogens, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1143-1148.
12. O. Teronen, Y.T. Konttinen, T. Salo, C. Lindqvist, P. Heikkilä, M. Laitinen & T. Sorsa, Bisfosfonaatit estävät kudosen syöntejä - uusi mahdollinen vaikutusmekanismi, *Duodecim.* **1999**, 115, 13-15.
13. P. Mustajoki, Pagetin tauti luustossa, *Duodecim.* **2015** 15.5.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00761.

14. Myositis Ossificans, <http://www.sportsinjuryclinic.net/sport-injuries/thigh-pain/myositis-ossificans>, Sportsinjuryclinic, (7.6.2015).
15. Bisphosphonates. About bisphosphonate medicines., <http://patient.info/health/bisphosphonates>, Patient, (15.9.2015).
16. Y. Catel, M. Degrange, L.L. Pluart, P-J. Madec, T-N. Pham, F. Chen & W.D. Cook, Synthesis, photopolymerization, and adhesive properties of new bisphosphonic acid monomers for dental application, *Inc. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2009**, 47, 5258-5271.
17. A. Ezra, A. Hoffman, E. Breuer, I.S. Alferiev, J. Mönkkönen, N. El Hanany-Rozen, G. Weiss, D. Stepensky, I. Gati, H. Cohen, S. Törmälehto, G.L. Amidon & G. Golomb, A Peptide Prodrug Approach for Improving Bisphosphonate Oral Absorption, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3641-3652.
18. K.A. Kennel & M.T. Drake, Adverse Effects of Bisphosphonates : Implications of Osteoporosis Management, *Mayo. Clin. Proc.* **2009**, 84(7), 632-638.
19. L. Dalle Carbonare, M. Zanatta, A. Gasparetto & M.T. Valenti, Safety and tolerability of zoledronic acid and other bisphosphonates in osteoporosis management, *Drug, Healthc. Patient Saf.*, **2010**, 2, 121-137.
20. K. Ogawa & H. Saji, Advances in Drug Design of Radiometal-Based Imaging Agents for Bone Disorders, *Int. J. Mol. Imaging.* **2011**.
21. Suomen Osteoporoosiyhdistys - Osteouutiset, <http://suomenosteoporoosiyhdistys.fi/>, Suomen Osteoporoosiyhdistys ry, (16.5.2015).
22. Ibandronat Actavis 150 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/nam/html/nam/humpil/8/12642788.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
23. Ibandronat Actavis 50 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/nam/html/nam/humpil/9/12642999.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
24. Bonviva, <http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=14044>, Lääketietokeskus, (8.9.2015).
25. Fosavance, http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=14005&d=2085423&i=MSD_FOSAVANCE_FOSAVANCE+tabletti+70+mg%2F2800+IU, Lääketietokeskus, (8.9.2015).
26. Fosamax, <http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=549>, Lääketietokeskus, (8.9.2015).

27. Bonasol 70 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/svenska/html/nam/humpil/8/13339628.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
28. Alendronat ratiopharm 70 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/nam/html/nam/humpil/6/10874536.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
29. Aclasta 5mg/100ml, <http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=13843>, Lääketietokeskus, (8.9.2015).
30. Vionate 35 mg, http://www.laakeohje.fi/files/1279539544209_fisv.pdf, Lääketieto Oy, (8.9.2015).
31. Risedronat Sandoz/Teva 35 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/nam/html/nam/humspc/9/10763259.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
32. Optinate Septimum 35 mg, <http://spc.fimea.fi/indox/nam/html/nam/humpil/0/499820.pdf>, Fimea, (8.9.2015).
33. Bisphosphonate Side Effects, <http://www.news-medical.net/health/Bisphosphonate-Side-Effects.aspx>, A. Mandal, (16.5.2015).
34. Secondary Hyperparathyroidism, http://endocrinediseases.org/parathyroid/secondary_hyperparathyroidism.shtml, The American Association of Endocrine Surgeons, (27.7.2015).
35. R.N. Bhatt, S.A. Hibbert & C.F. Munns, The use of bisphosphonates in children: review of the literature and guidelines for dental management, *Aust. Dent. J.* **2014**, *59*, 9-19.
36. R.G.G. Russell, Bisphosphonates - From Bench to Bedside, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1068*, 367-401.
37. A. Grey & I.R. Reid, Differences between the bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis, *Ther. Clin. Risk. Manag.*, **2006**, *2*, 77-86.
38. A. Consolaro, The use of bisphosphonates does not contraindicate orthodontic and other types of treatment!, *Dental Press J. Orthod.*, **2014**, *19*, 18-26.
39. R.G.G. Russell, Z. Xia, J.E. Dunford, U. Oppermann, A. Kwaasi, P.A. Hulley, K.L. Kavanagh, J.T. Triffitt, M.W. Lundy, R.J. Phipps, B.L. Barnett, F.P. Coxon, M.J. Rogers, N.B. Watts & F.H. Ebetino, Bisphosphonates: An Update on Mechanisms of Action and How These Relate to Clinical Efficacy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1117*, 209-257.
40. G.J. Yakatan, W.J. Poynor, R.L. Talbert, B.F. Floyd, C.L. Slough, R.S. Ampulski & J.J. Benedict, Clodronate kinetics and bioavailability, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1982**, *31*, 402-410 .

41. J.J. Vepsäläinen, Bisphosphonate prodrugs, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, 9, 1075-1085.
42. A. Brayfield, *Martindale: The Complete Drug Reference*, 38. Painos, Pharmaceutical Press, 2014.
43. K. Ohgi, H. Kajiya, F. Okamoto, Y. Nagaoka, T. Onitsuka, A. Nagai, R. Sakagami & K. Okabe, A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl-extrusion in osteoclasts, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2013**, 386, 589-598.
44. D. Heymann, Bisphosphonates and Bone Diseases: Past, Present and Future, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 2948-2949.
45. M. Pazianas, B. Abrahamsen, S. Ferrari & R.G. Russell, Eliminating the need for fasting with oral administration of bisphosphonates, *Ther. Clin. Risk. Manag.*, **2013**, 9, 395-402.
46. M.J. Rogers, J.C. Crockett, F.P. Coxon & J. Mönkkönen, Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates, *Bone*. **2011**, 49, 34-41.
47. J.M. Sanders, S. Ghosh, J.M.W. Chan, G. Meints, H. Wang, A.M. Raker, Y. Song, A. Colantino, A. Burzynska, P. Kafarski, C.T. Morita & E. Oldfield, Quantitative Structure-Activity Relationships for gammadelta T Cell Activation by Bisphosphonates, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 375-384.
48. W. Holtmeier & D. Kabelitz, gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy.* **2005**, 86, 151-183.
49. H. Mönkkönen, S. Auriola, P. Lehenkari, M. Kellinsalmi, I.E. Hassinen, J. Vepsäläinen & J. Mönkkönen, A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates, *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, 437-445.
50. D. Gatti, M. Rossini, O. Viapiana, L. Idolazzi & S. Adami, Clinical development of neridronate: potential for new applications, *Ther. Clin. Risk Manag.*, **2013**, 9, 139-147.
51. New Medication For Treating CRPS in 2015? Neridronate is a new Bisphosphonate, <http://www.rsdhope.org/neridronate---new-medication-for-crps1.html>, American RSDHope, (12.2.2015).
52. A. Ezra & G. Golomb, Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 42, 175-195.
53. E.J.A. Roldán, A. Pérez & J.L. Roldán, Olpadronate: a new amino-bisphosphonate for the treatment of medical osteopathies, *Expert Opin. Investig. Drugs.* **1998**, 7, 1521-1538.

54. J. Barrett, E. Worth, F. Bauss & S. Epstein, Ibandronate: A Clinical Pharmacological and Pharmacokinetic Update, *J. Clin. Pharmacol.*, **2004**, *44*, 951-965.
55. K. Teramura, S. Fukushima, T. Iwai, K. Nozaki, S. Kokubo & K. Takahashi, Incadronate inhibits osteoporosis in ovariectomized rats, *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *457*, 51-56.
56. A. Hikosaka, M. Futakuchi, T. Ogiso, S. Suzuki, K. Kohri & T. Shirai, Lack of Prophylactic Effect of Incadronate on Skeletal Lesions Associated with Implants of Prostate Cancer, *Eur. Urol.* **2006**, *49*, 176-182.
57. M. Ito, M. Chokki, Y. Ogino, Y. Satomi, Y. Azuma, T. Ohta & M. Kiyoki, Comparison of Cytotoxic Effects of Bisphosphonates In Vitro and In Vivo, *Calcif. Tissue Int.* **1998**, *63*, 143-147.
58. S.K. Singh, N. Manne, P.C. Ray & M. Pal, Synthesis of imidazol-1-yl-acetic acid hydrochloride: A key intermediate for zoledronic acid, *J. Org. Chem.* **2008**, *4*, 42.
59. H. Valleala, Sekundaariosteoporoosi: Kortisoni ja osteoporoosi, *Osteo.* **2011**, *3*, 6-7.
60. H. Soini, *Lääkehaittatapahtumat suun terveydenhuollossa – Tutkimus hammaslääkäreiden ilmoittamista lääkkeiden haittavaikutuksista*, Savonia Ammattikorkeakoulu, 2013.
61. Zolendronate, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00399>, DrugBank, (12.2.2015).
62. T. Kiyama, S. Okada, Y. Tanaka, S. Kim, K. Bando, M. Hasegawa, K. Yamaguchi, T. Takano-Yamamoto, K. Sasaki, S. Sugawara & Y. Endo, Inflammatory and Necrotic Effects of Minodronate, a Nitrogen-Containing Bisphosphonate, in Mice, *Tohoku J. Exp. Med.* **2013**, *230*, 141-149.
63. Z. Yu, H. Funayama, X. Deng, T. Kuroishi, T. Sasano, S. Sugawara & Y. Endo, Comparative Appraisal of Clodronate, Aspirin and Dexamethasone as Agents Reducing Alendronate-induced Inflammation in a Murine Model, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, *97*, 222-229.
64. D.E. Hughes, K.R. Wright, H.L. Uy, A. Sasaki, T. Yoneda, D.G. Roodman, G.R. Mundy & B.F. Boyce, Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, *J. Bone Miner. Res.*, **1995**, *10*, 1478-1487.
65. S.T. Harris, N.B. Watts, H.K. Genant, C.D. McKeever, T. Hangartner, M. Keller, C.H. Chesnut, J. Brown, E.F. Eriksen, M.S. Hoseney, D.W. Axelrod & P.D. Miller, Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial, *JAMA.* **1999**, *282*, 1344-1352.
66. D.V.N.S. Rao, R. Dandala, R. Lenin, M. Svakumaran, S. Shivashankar & A. Naidu, A facile one pot synthesis of bisphosphonic acids and their sodium salts from nitriles, *ARKIVOC.* **2007**, *14*, 34-38.

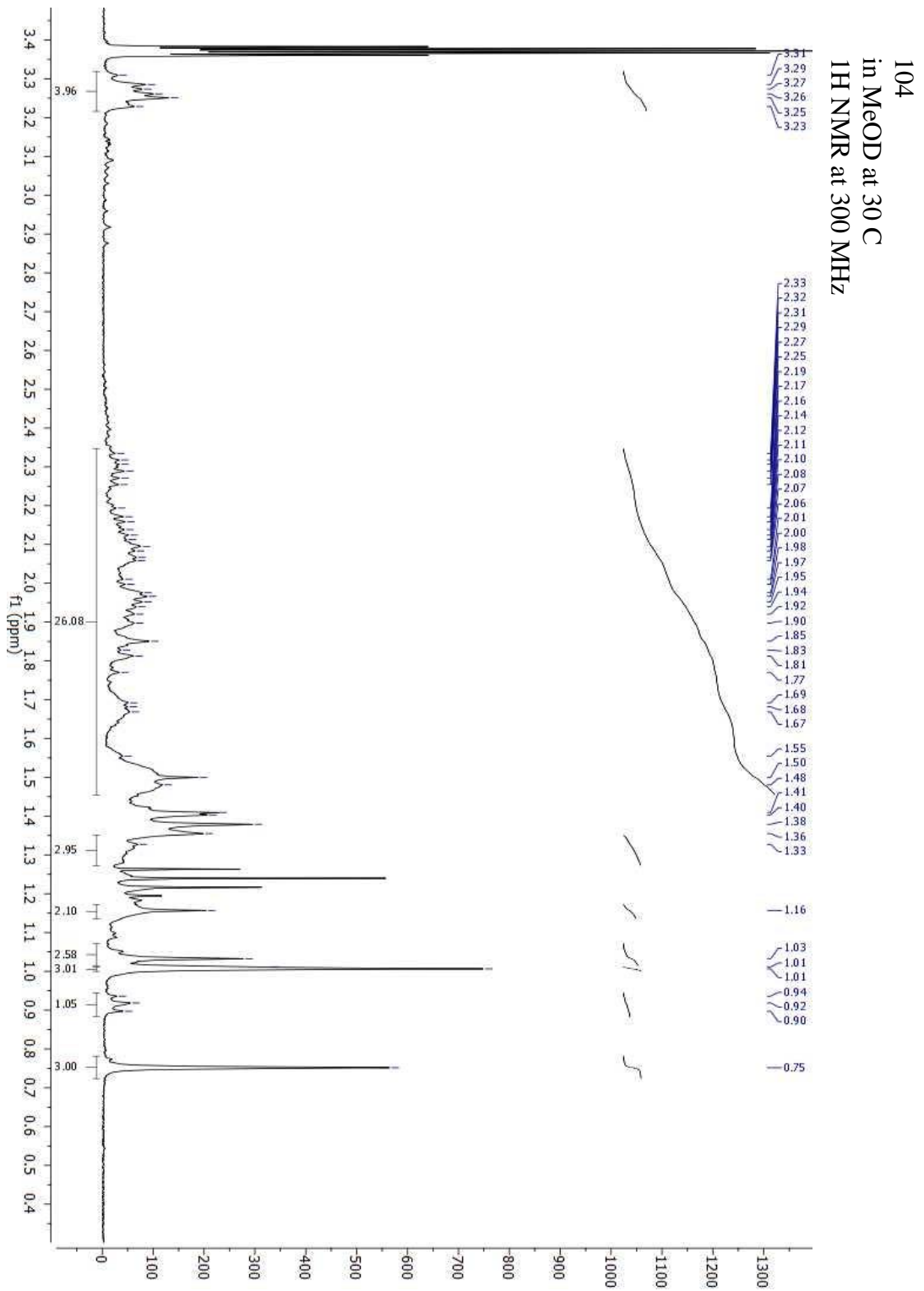
67. M. Lecouvey & Y. Leroux, Synthesis of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonates, *Heteroatom Chemistry*, **2000**, *11*, 556-561.
68. G.R. Kieczkowski, R.B. Jobson, D.G. Melillo, D.F. Reinhold, V.J. Grenda & I. Shinkai, Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidene)bisphosphonic Acid Sodium Salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An Improved Procedure for the Preparation of 1-Hydroxy-1,1-bisphosphonic Acids, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310-8312.
69. D.I. Goules, K.G. Kolovos & I.D. Goules, Synthesis, chemical characteristics and therapeutic act of bisphosphonate derivatives. Part 1: Chemical approach, **2005**, http://www.academia.edu/1478365/Synthesis_chemical_characteristics_and_therapeutic_act_of_bisphosphonate_derivatives_Part_I_Chemical_approach.
70. M. Wu, R. Chen & Y. Huang, Convenient Synthesis of Analogs of Aminomethylene gem-Diphosphonic Acid from Amines Without Catalyst, *Synth. Comm.*, **2004**, *34*, 1393-1398.
71. M. Takeuchi, S. Sakamoto, M. Yoshida, T. Abe & Y. Isomura, Studies on Novel Bone Resorption Inhibitors. I. Synthesis and Pharmacological Activities of Aminomethylenebisphosphonate Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 688-693.
72. E. Dąbrowska, A. Burzyńska, A. Mucha, E. Matczak-Jon, W. Sawka-Dobrowolska, L. Berlicki & P. Kafarski, Insight into the mechanism of three component condensation leading to aminomethylenebisphosphonates, *J. Org. Chem.*, **2009**, *694*, 3806-3813.
73. I.S. Alferiev & S.Y. Bobkov, Cyclic Oligophosphonic Anhydrides Stable in Aqueous Media, *Zeitschrift für Naturforschung B*, **2014**, *47*, 1213.
74. G.L. Matevosyan, I.Y. Matyushichev & P.M. Zavlin, Phosphorylation of nitrogen heterocycles. XII. Phosphorylpropylation of benzimidazole, *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)*. **1987**, *57*, 939-942.
75. J. McNulty & P. Das, Development of a one-pot method for the homologation of aldehydes to carboxylic acids, *Tetrahedron*. **2009**, *65*, 7794-7800.
76. S. Gouault-Bironneau, S. Deprele, A. Sutor & J-L. Montchamp, Radical Reaction of Sodium Hypophosphite with Terminal Alkynes: Synthesis of 1,1-Bis-H-phosphinates, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5909-5912.
77. D.A. Mustafa, B.A. Kashemirov & C.E. McKenna, Microwave-assisted synthesis of nitrogen-containing 1-hydroxymethylenebisphosphonate drugs, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2285-2287.
78. R. Lenin, R.M. Raju, D. Rao, V.N.S. Divvela & U.K. Ray, Microwave-assisted efficient synthesis of bisphosphonate libraries: a useful procedure for the preparation of bisphosphonates containing nitrogen and sulfur, *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 1624-1629.

79. A. Grün, I.G. Molnár, B. Bertók, I. Greiner & G. Keglevich, Synthesis of α -hydroxy-methylenebisphosphonates by the microwave-assisted reaction of α -oxophosphonates and dialkyl phosphites under solventless conditions, *Heteroatom Chemistry*, **2009**, *20*, 350-354.
80. M. Ahlmark, Design and synthesis of novel (dichloromethylene)bisphosphonates as prodrugs of clodronate - in vitro evaluation of potential compounds, Väitöskirja, Kuopion yliopisto, Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta, Kuopio, **2000**.
81. K. Hochdörffer, K. Abu Ajaj, C. Schöfer-Obodozie & F. Kratz, Development of Novel Bisphosphonate Prodrugs of Doxorubicin for Targeting Bone Metastases That Are Cleaved pH Dependently or by Cathepsin B: Synthesis, Cleavage Properties, and Binding Properties to Hydroxyapatite As Well As Bone Matrix, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7502-7515.
82. P. Vachal, J.J. Hale, Z. Lu, E.C. Streckfuss, S.G. Mills, M. MacCoss, D.H. Yin, K. Algayer, K. Manser, F. Kesisoglou, S. Ghosh & L.L. Alani, Synthesis and Study of Alendronate Derivatives as Potential Prodrugs of Alendronate Sodium for the Treatment of Low Bone Density and Osteoporosis, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3060-3063.
83. P.A. Turhanen, J. Weisell & J.J. Vepsäläinen, Preparation of mixed trialkyl alkylcarbonate derivatives of etidronic acid via an unusual route, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 2019-2024.
84. P.A. Turhanen, Synthesis of Triple-Bond-Containing 1-Hydroxy-1, 1-bisphosphonic Acid Derivatives To Be Used as Precursors in "Click" Chemistry: Two Examples, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6330-6335.
85. P.A. Turhanen & J.J. Vepsäläinen, The First Synthesis of Novel (1-Alkoxy-carbonyloxyethylidene)-1,1-bisphosphonic Acid Derivatives Taking Advantage of the Rearrangement Characteristic of the Tetramethyl Ester of Etidronate, *Synthesis*. **2005**, *13*, 2119-2121.
86. P.A. Turhanen & J.J. Vepsäläinen, Unexpected degradation of the bisphosphonate PCP bridge under mild conditions, *Beilstein J. Org. Chem.* **2008**, *4*, 7.
87. P.A. Turhanen, M.J. Ahlgren, T. Järvinen & J.J. Vepsäläinen, Bisphosphonate prodrugs. Synthesis and identification of (1-hydroxyethylidene)-1, 1-bisphosphonic acid tetraesters by mass spectrometry, NMR spectroscopy and X-ray crystallography, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2001**, *170*, 115-133.
88. P.A. Turhanen, R. Niemi, M. Peräkylä, T. Järvinen & J.J. Vepsäläinen, First synthesis of etidronate partial amides starting from PCl_3 , *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 3223-3226.
89. R. Niemi, P. Turhanen, J. Vepsäläinen, H. Taipale & T. Järvinen, Bisphosphonate prodrugs: synthesis and in vitro evaluation of alkyl and acyloxymethyl esters of etidronic acid as bioreversible prodrugs of etidronate, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, *11*, 173-180.

90. R. Niemi, H. Taipale, M. Ahlmark, J. Vepsäläinen & T. Järvinen, Simultaneous determination of clodronate and its partial ester derivatives by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. App.*, **1997**, *701*, 97-102.
91. R. Niemi, H. Pennanen, J. Vepsäläinen, H. Taipale & T. Järvinen, Bisphosphonate prodrugs: synthesis and in vitro evaluation of novel partial amides of clodronic acid, *Int. J. Pharm.* **1998**, *174*, 111-115.
92. R. Niemi, J. Vepsäläinen, H. Taipale & T. Järvinen, Bisphosphonate Prodrugs: Synthesis and in Vitro Evaluation of Novel Acyloxyalkyl Esters of Clodronic Acid, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5053-5058.
93. J.J. Vepsäläinen, Bisphosphonate prodrugs: a new synthetic strategy to tetraacyloxymethyl esters of methylenebisphosphonates, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8491-8493.
94. J.J. Vepsäläinen, J. Kivikoski, M. Ahlgrén, H.E. Nupponen & E.K. Pohjala, An improved synthetic method and the first crystal structures for (dihalomethylene)bisphosphonate partial esters, *Tetrahedron.* **1995**, *51*, 6805-6818.
95. B.M. Choudary & P.N. Reddy, Vanadium-Catalysed Oxidative Ring Cleavage of Cyclic Acetals. A Facile Synthesis of Glycol Monoesters, *Synlett*, **1995**, *1995*, 959-960.
96. M. Monteil, E. Guenin, E. Migianu, D. Lutomski & M. Lecouvey, Bisphosphonate prodrugs: synthesis of new aromatic and aliphatic 1-hydroxy-1,1-bisphosphonate partial esters, *Tetrahedron.* **2005**, *61*, 7528-7537.
97. M. Monteil, E. Migianu-Griffoni, O. Sainte-Catherine, M. Di Benedetto & M. Lecouvey, Bisphosphonate prodrugs: Synthesis and biological evaluation in HuH7 hepatocarcinoma cells, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 56-64.
98. R. Erez, S. Ebner, B. Attali & D. Shabat, Chemotherapeutic bone-targeted bisphosphonate prodrugs with hydrolytic mode of activation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 816-820.
99. O.P. Varghese, W. Sun, J. Hilborn & D.A. Ossipov, In Situ Cross-Linkable High Molecular Weight Hyaluronan-Bisphosphonate Conjugate for Localized Delivery and Cell-Specific Targeting: A Hydrogel Linked Prodrug Approach, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8781-8783.
100. X.Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M.C. Roberts & G.D. Prestwich, Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels, *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 1304-1311.
101. T.J. Houghton, K.S.E. Tanaka, T. Kang, E. Dietrich, Y. Lafontaine, D. Delorme, S.S. Ferreira, F. Viens, F.F. Arhin, I. Sarmiento, D. Lehoux, I. Fadhil, K. Laquerre, J. Liu, V. Ostiguy, H. Poirier, G. Moeck, T.R. Parr & A.R. Far, Linking Bisphosphonates to the Free Amino Groups in Fluoroquinolones: Preparation of

- Osteotropic Prodrugs for the Prevention of Osteomyelitis, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6955-6969.
102. H. Hirabayashi, T. Takahashi, J. Fujisaki, T. Masunaga, S. Sato, J. Hiroi, Y. Tokunaga, S. Kimura & T. Hata, Bone-specific delivery and sustained release of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, via bisphosphonic prodrug based on the Osteotropic Drug Delivery System (ODDS), *J. Control. Release.* **2001**, *70*, 183-191.
 103. F. Bauss, A. Esswein, K. Reiff, G. Sponer & B. Møller-Beckmann, Effect of 17 β -estradiol-bisphosphonate conjugates, potential bone-seeking estrogen prodrugs, on 17 β -estradiol serum kinetics and bone mass in rats, *Calcif. Tissue Int.* **1996**, *59*, 168-173.
 104. H. Nakatake, H. Ekimoto, M. Aso, A. Ogawa, A. Yamaguchi & H. Suemune, Dialkyl Bisphosphonate Platinum(II) Complex as a Potential Drug for Metastatic Bone Tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, *59*, 710-713.
 105. E. Sievänen, Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design, *Molecules*, **2007**, *12*, 1859.
 106. D. Kritchevsky & P.P. Nair, *The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism*. Kirjassa: Anonymous (toim.), *Volume 1: Chemistry*, Springer US, Plenum Press, New York, 1971, ss. 3-9.
 107. 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.
 108. P.A. Turhanen & J.J. Vepsäläinen, Synthesis of novel (1-alkanoyloxy-4-alkanoylamino-butylidene)-1,1-bisphosphonic acid derivatives, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2006**, *2*, 2-2.
 109. E. Kolehmainen, J. Tamminen, K. Lappalainen, T. Torkkel & R. Seppälä, Substituted Methyl 5 β -Cholan-24-oates; Part III: Synthesis of a Novel Cholaphane from Ethylene Glycol Diester of Lithocholic Acid by Cyclization with Terephthalic Acid, *Synthesis*, **1996**, *9*, 1082-1084.

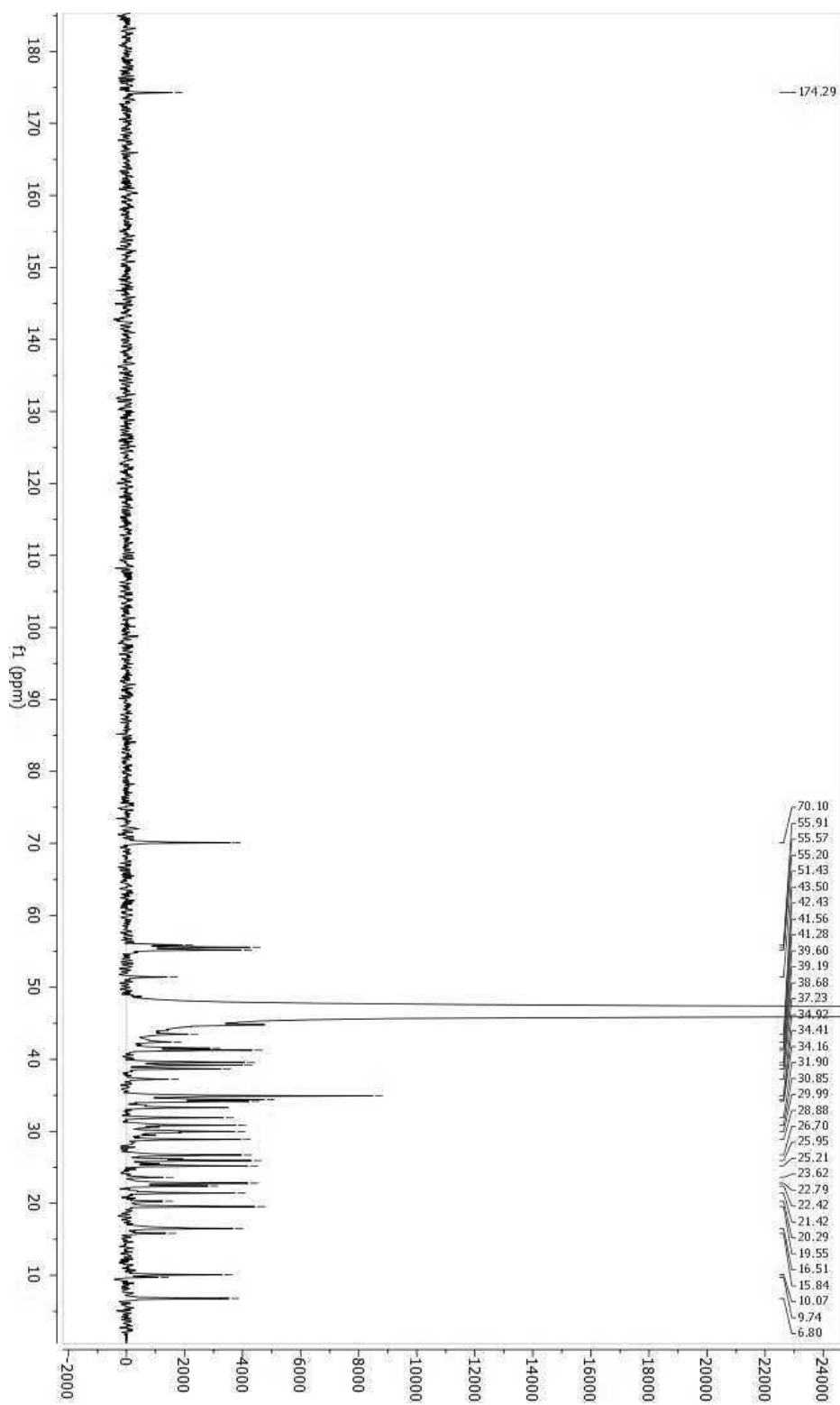
Liitteet



Alendronaatin litokoolihappojohdannaisen ¹H NMR -spektri.

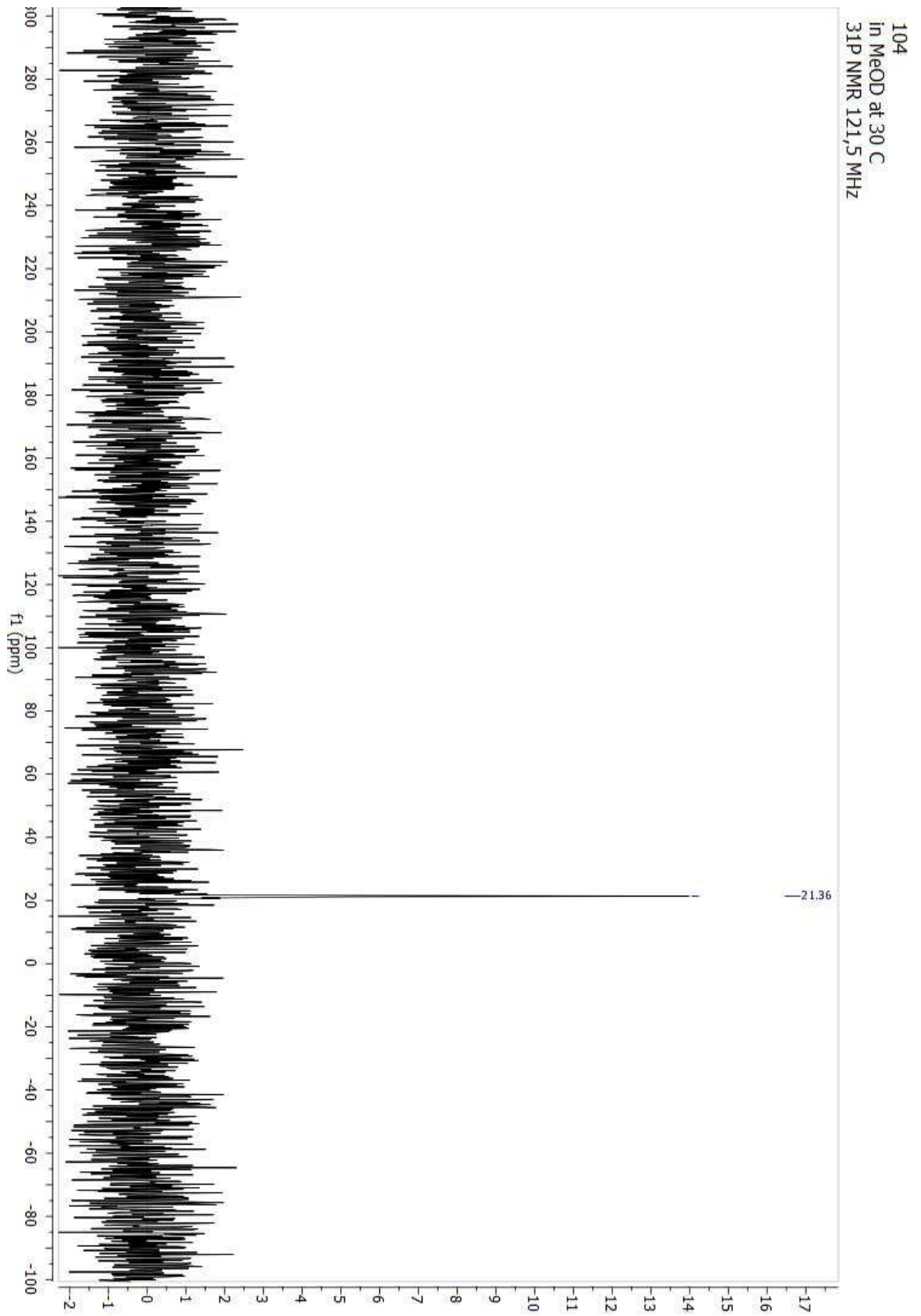
Liite 1-2

104
In MeOD at 50 C
13C NMR at 126 MHz w. BBI



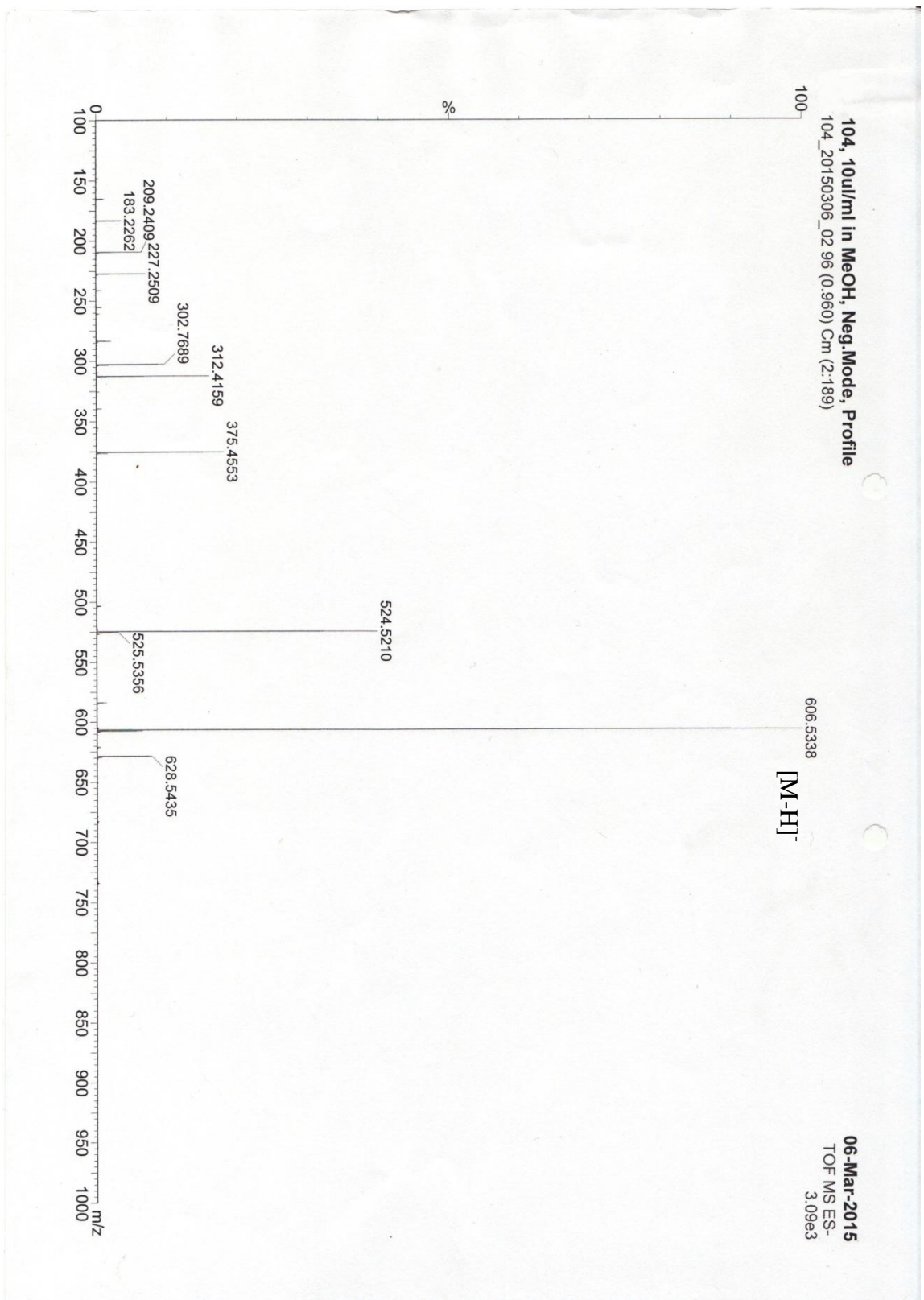
Alendronaatin litokoolihappojohdannaisen ^{13}C NMR -spektri.

Liite 1-3



Alendronaatin litokoolihappojohdannaisen ^{31}P NMR -spektri.

Liite 1-4



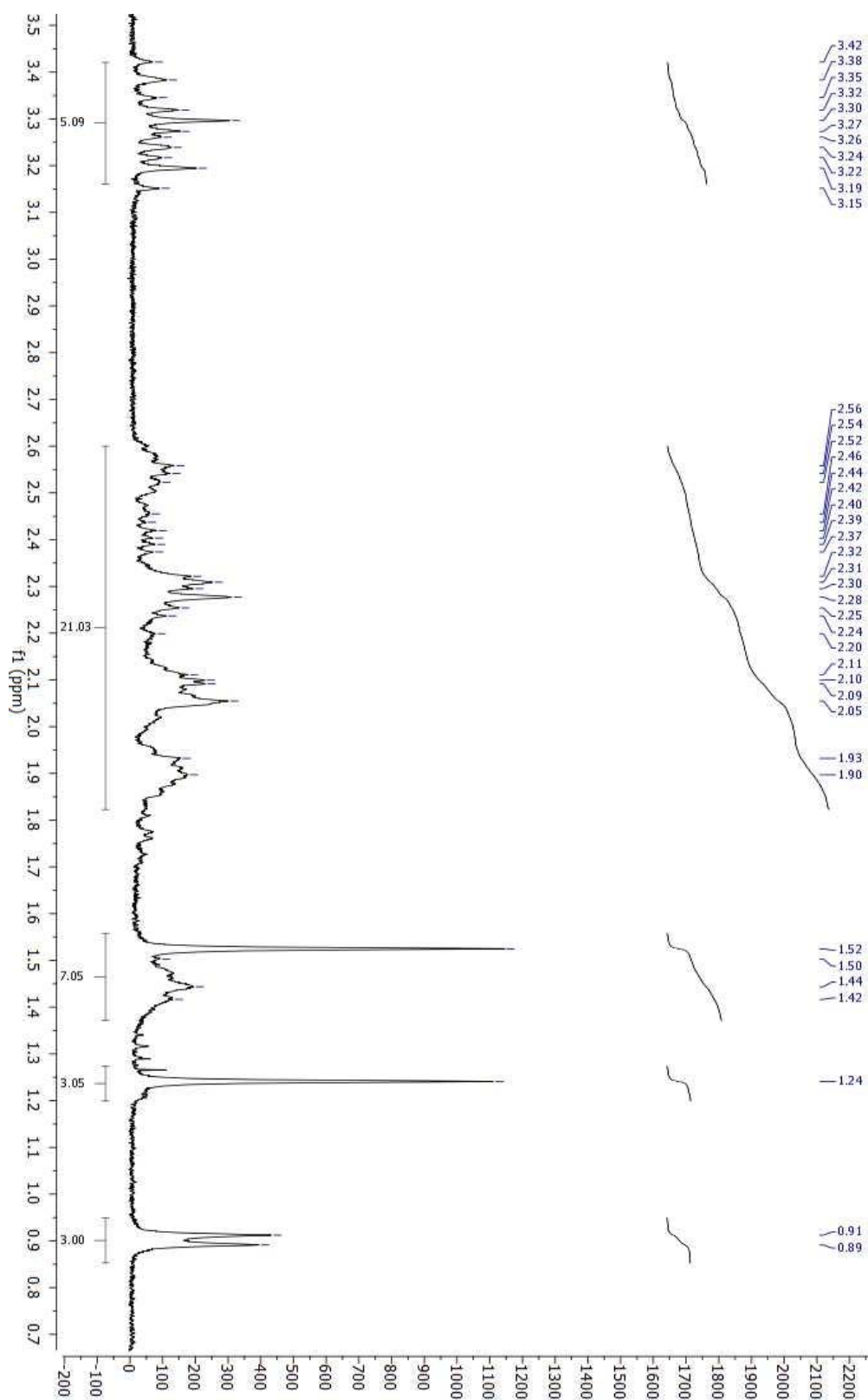
Alendronaatin litokoolihappojohdannaisen MS-spektri, neg. mode.

Liite 2-1

108

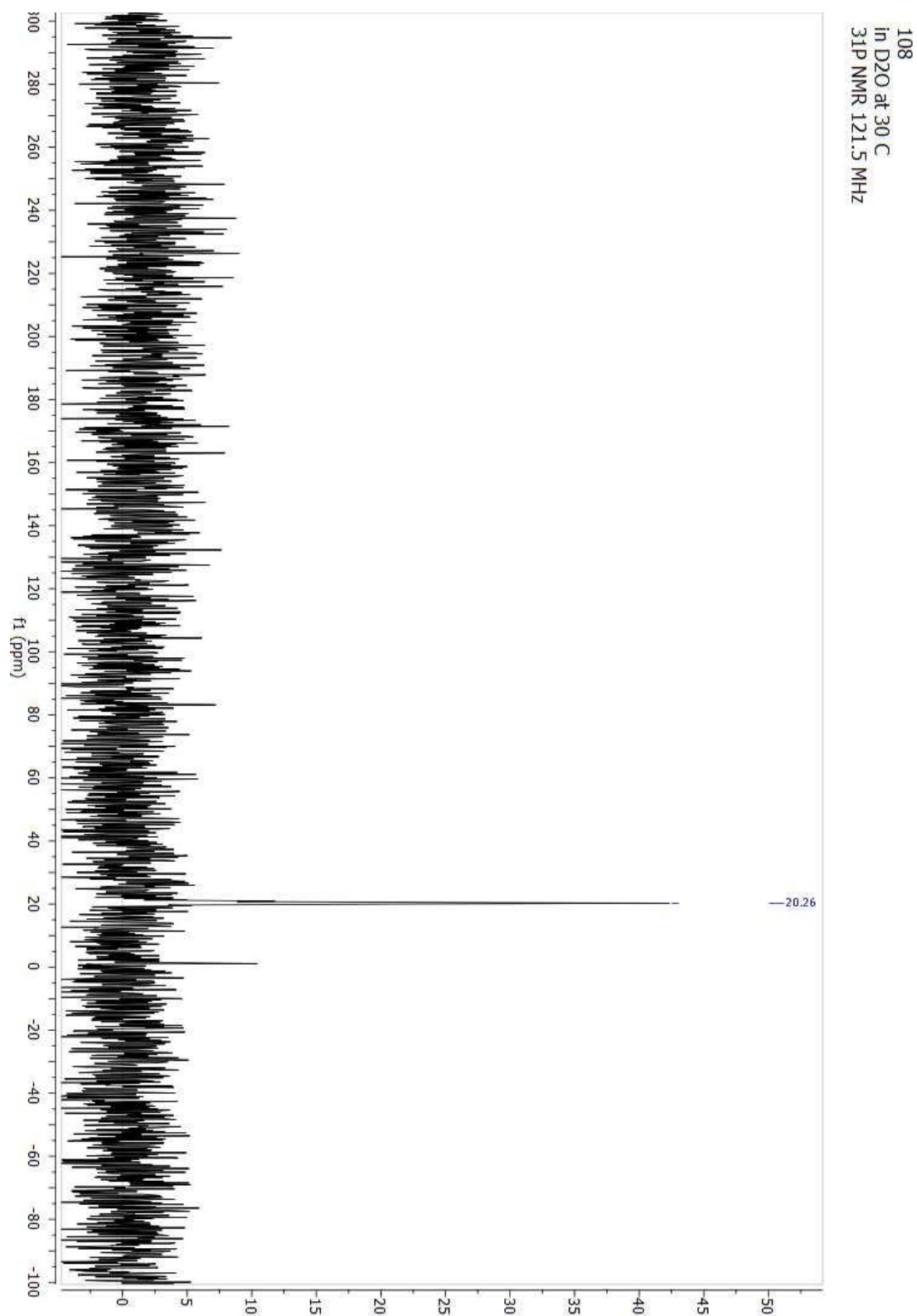
in D₂O at 30 C

¹H NMR at 300 MHz



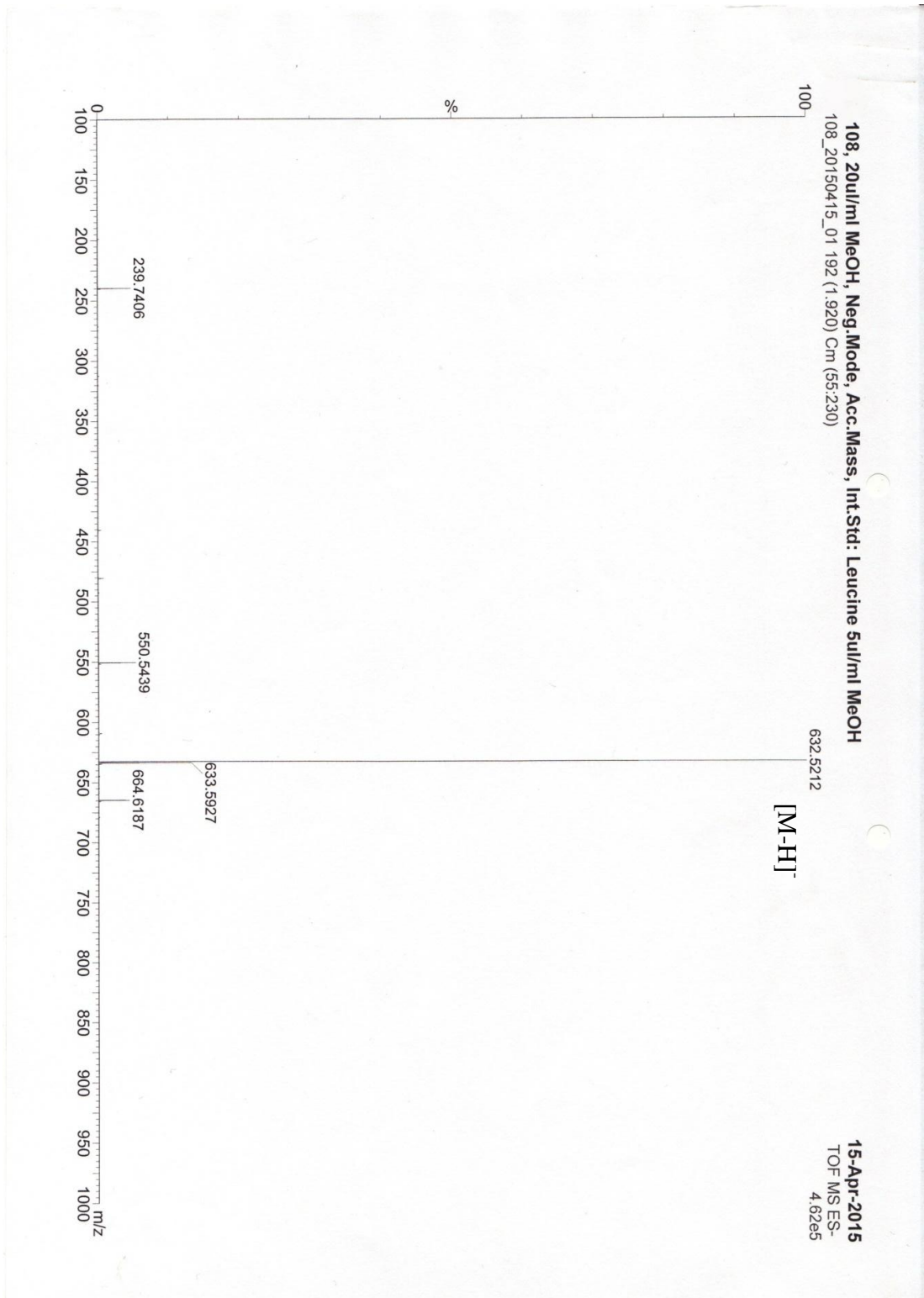
Alendronaatin dehydrokoolihappojohdannaisen ¹H NMR -spektri.

Liite 2-2



Alendronaatin dehydrokoolihappojohdannaisen ^{31}P NMR -spektri.

Liite 2-3



Alendronaatin dehydrokoolihappojohdannaisen MS-spektri.