

Oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit lääketieteellisissä sovelluksissa

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaaninen kemia

12.5.2016

Essi Taipaleenmäki

Tiivistelmä

Pro Gradu -tutkielmassa käsitellään oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden sovelluksia lääketieteessä. Tutkielmassa käydään läpi kultananopartikkeleiden yleisiä ominaisuuksia sekä niiden soveltuvuutta biologisiin ja lääketieteellisiin sovelluksiin. Lisäksi esitellään yleisimmät kultananopartikkeleiden päällystyksessä käytettävät oligopeptidit ja kuvataan erityyppisille oligopeptidipäällysteisille kultananopartikkeleille kehitettyjä lääketieteellisiä sovelluksia, joihin lukeutuvat muun muassa syöpähoito, biologinen kuvantaminen, kolorimetriset biomolekyylianalyysit ja lääkeaineiden kohdennettu kuljetus. Kokeellisessa osassa pyrittiin valmistamaan tiolifunktionalisoitu oligopeptidi, joka voitaisiin kiinnittää $\text{Au}_{102}(\text{pMBA})_{44}$ kultaklustereiden pintaan ligandinvaihdolla.

Esipuhe

Pro Gradu -tutkielma kirjoitettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella syylukukauden 2015 ja kevätlukukauden 2016 aikana. Kokeellinen osa tehtiin Jyväskylän yliopiston Nanotiedekeskuksen synteasilaboratoriossa syylukukauden 2015 aikana. Tutkielmassa käytetyt julkaisut on löydetty SciFinder- tai Web of Science -tietokannoista tai saatu professori Maija Nissiseltä. Tahdon kiittää pro gradu -tutkielmani ohjaajaa Maija Nissistä erittäin mielenkiintoisen ja omia toiveitani vastanneen tutkimusprojektin luomisesta lyhyellä varoitusaajalla sekä kannustavasta palautteesta kirjoitusprosessin aikana. Kiitän erikoistyöni ohjaajaa yliopistonlehtori Tanja Lahtista ohjauksesta ja käytännön neuvoista, mutta ennen kaikkea väsymättömästä ja positiivisesta asenteesta, joka auttoi minua uskomaan omaan osaamiseeni ja jaksamaan läpi kokeellisen osuuden. Tahdon kiittää myös tohtorikoulutettava Riia Annalaa UV-VIS-spektrometrin käytön opastuksesta sekä tutkijatohtori Kaisa Helttusta, joka vastaili kysymyksiini laboratoriossa, opasti Flash-kromatografialaitteiston käytössä sekä määrittä syntetisoimani tuotteen kiderakenteen tutkielmaani varten.

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1 Kultananopartikkeleiden bioyhteensopivuus.....	3
1.2 Kultananopartikkelit lääkeaineiden kuljetuksessa.....	5
2. Oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit	6
2.1 Glutationipäällysteiset kultananopartikkelit.....	7
2.1.1 Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden biojakautuminen ja toksisuus.....	9
2.1.2 Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden sovellukset.....	10
2.2 Soluun ja tumaan ohjaavat oligopeptidit kultananopartikkeleiden päällystyksessä.....	16
2.2.1 Soluun ja tumaan ohjautuvat kultananopartikkelit syövän hoidossa.....	22
2.3 Synteettiset oligopeptidit kultananopartikkeleiden päällystyksessä.....	25
2.3.1 CALNN-oligopeptidillä ja sen johdannaisilla päällystettyjen kultananopartikkeleiden kolorimetriset sovellukset.....	27
2.4 Terapeuttiset oligopeptidit.....	32
2.5 Muita sovelluksia.....	35
3. Yhteenveto	38
KOKEELLINEN OSA	
4. Työn tarkoitus	41
5. Reaktiomekanismit	42
5.1 Amidin valmistaminen aminohapon esteristä HOBt- ja EDC- katalysoidulla nukleofiilisella substituutiolla.....	42
5.2 Aminohappojen α -karboksyyliiryhmän etyyliesterisuojausten purku emäskatalysoidulla hydrolyysillä.....	44
5.3 Aminohappojen α -karboksyyliiryhmän etyyliesterisuojausten purku happokatalysoidulla hydrolyysillä.....	45
5.4 Emäskatalysoitu aminohappojen α -aminoryhmän Fmoc-suojausten purku.....	46
6. Käytetyt laitteet, menetelmät ja reagenssit	47
7. Synteetit	49
7.1 <i>N</i> -bentsoyyli-L-alaniinietyyliesteri.....	49

7.2 <i>N</i> -(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)- <i>L</i> -fenyylialaniini- <i>L</i> - alaniinietyyliesteri.....	53
7.3 4,4-Ditiolibisbentsoehappo	57
7.4 <i>N</i> -alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehappo	59
7.5 Emäskatalysoitu aminohapon α -karboksyyli­ryhmän etyyliesterisuo­jauksen purku.....	62
7.5.1 <i>L</i> -alaniinietyyliesterinhydrokloridin etyyliesterisuo­jauksen purku.....	63
7.5.2 <i>N</i> -alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuo­jauksen purku.....	64
7.6 Happokatalysoitu <i>N</i> -alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuo­jauksen purku.....	66
7.6.1 <i>N</i> -alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuo­jauksen purku vetykloridilla.....	66
7.6.2 <i>N</i> -alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuo­jauksen purku riikkihapolla.....	67
7.7 Fmoc- <i>L</i> -fenyylialaniinin α -aminoryhmän Fmoc-suo­jauksen purku	69
8. Yhteenveto.....	70
9. Valmisteut yhdisteet.....	72
Viitteet.....	73
Liitteet.....	82

Käytetyt lyhenteet

ABA	abskissihappo
ABA-GE	abskissihapon glukoosiesteri (abscisic acid glucose ester)
BSA	boviini seerumi albumiini
CCD	valoherkkä kenno (charge-coupled device)
DCM	dikloorimetaani
DIC	differentiaali-interferenssikontrasti
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DMSO-d ₆	deuteroitu dimetyylisulfoksidi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EDC	<i>N</i> -(3-dimetyyliaminopropyli)- <i>N</i> '-etylikarbodiimidi
EPR	tehostunut permeabilitetti ja retentio (enhanced permeability and retention)
6-FAM	6-karboksifluoreseiini
Fmoc	<i>N</i> -(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)
GSH	glutationi
HA2	influenssaviruksen hemagglutiniiniproteiini
HaCat	ihmisen keratinosyyttisolut (human keratinocytes)
HIV	HI-virus (human immunodeficiency virus)
HMQC	heteronukleaarinen monikvanttikorrelaatio (heteronuclear multiple-quantum correlation)
HOBt	1-hydroksibentsotriatsolihydraatti
HSC	ihmisen oraallinen okasolukarsinooma (human oral squamous cell carcinoma)
ICP	induktiivisesti kytketty plasma (inductively coupled plasma)
ID	injektoitu annos (injected dose)
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography
LSPR	paikallistunut pintaplasmoniresonanssi (localized surface plasmon resonance)
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
Nrp-1	Neuropilin-1-reseptori
OES	optinen emissiospektroskopia

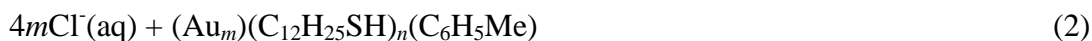
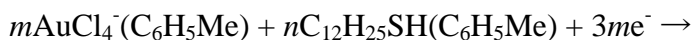
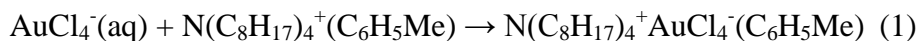
PEG	polyetyleeniglykoli
pMBA	para-merkaptobentsoehappo
QCM	kvartsikidemikrovaaka (quartz crystal microbalance)
RES	retikuloendoteelinen järjestelmä
RNA	ribonukleiinihappo
SH-SY5Y	ihmisen neuroblastoomasolu
siRNA	pieni häiritsevä riboosinukleiinihappo (small interfering ribonucleic acid)
SPION	superparamagneettinen rautaoksidinanopartikkeli
SV40	Simian vacuolating virus 40
THF	tetrahydrofuraani
TOABr	tetraoktyyliammoniumbromidi
UV-VIS	ultravioletti-näkyvä valo
VEGFR-1	verisuonen endoteelin kasvutekijän reseptori (vascular endothelial growth factor receptor)
VEC	video-vahvistettu väri (video enhanced color)

1. Johdanto

Liukenevaa kultaa osattiin hyödyntää Egyptissä ja Kiinassa todennäköisesti jo ennen ajanlaskun alkua.¹ Kolloidista kultaa käytettiin muun muassa keraamisten astioiden värjäykseen ja keskiajalla sillä uskottiin olevan sairauksia parantavia vaikutuksia. Kolloidisen kullan kemiallinen luonne alkoi hahmottua yksityiskohtaisemmin 1850-luvun lopulla, kun Michael Faraday onnistui pelkistämään tetrakloorikultahappoa (HAuCl_4) fosforilla hiilidisulfidia sisältävässä reaktioseoksessa. Tämän jälkeen 1900-luvun aikana raportoitiin useita erilaisia tapoja valmistaa kolloidista kultaa, mutta intensiivisintä aiheeseen liittyvä tutkimus on ollut kuluneen vuosikymmenen aikana.

Kultananopartikkeli käsittää kulta-atomeista koostuvan metallisen ytimen, jota ympäröi orgaanisista ligandeista muodostuva kuori. Kultananopartikkelit valmistetaan tyypillisesti pelkistämällä HAuCl_4 :n hapetusasteella kolme olevaa kultaa.¹ Muodostuvat partikkelit ovat usein lähes pyöreitä, sillä kyseinen rakenne minimoi pinta-alan ja on energialtaan siten alhaisin.² Niin kutsutulla Turkevitch-menetelmällä³ pelkistys tehdään vesiliuoksessa sitruunahapon suolalla. Menetelmä tuottaa verrattain suurikokoisia, halkaisijaltaan noin 20 nm kokoluokkaa olevia partikkeleita. Kokoa voidaan säädellä esimerkiksi synteisivaiheessa reaktioseokseen lisättävien pinta-aktiivisten aineiden avulla vaihtelemalla pinta-aktiivisten aineiden, pelkistimen ja kullan välisiä ainemääräsuhteita.

Vuonna 1994 julkaistiin niin kutsuttu Brust-Schiffrin -menetelmä,⁴ joka hyödyntää kaksifaasisista systeemiä. Synteessissä AuCl_4^- -ionit siirretään tetraoktyyliammoniumbromidin (TOABr) mukana orgaaniseen faasiin, jossa ne pelkistetään natriumboorihydridillä (NaBH_4). Synteessin oleellisia komponentteja ovat alkaanitiolit, jotka muodostavat reaktiossa kultananopartikkeleita stabiloivan kuorirakenteen partikkeleiden ympärille. Tämä perustuu siihen, että pehmeänä Lewis-happona kulta reagoi mielellään pehmeän Lewis-emäksen kanssa. Kyseistä menetelmää voidaan pitää käännteentekeväenä, sillä se mahdollisti stabiilien ja pienikokoisten, halkaisijaltaan noin 1.5–5.2 nm olevien nanopartikkeleiden valmistuksen kapealla kokojakaumalla. Reaktio on kuvattu alla kokonaisuudessaan reaktioyhtälöillä (1) ja (2), joissa elektronien lähteenä on BH_4^- .



Alkaanitiolit ja muut kultananopartikkeleiden päällystyksessä käytettävät ligandit stabiloivat kultananopartikkeleita suojaamalla niitä sekä steerisesti että elektronisesti hajoamiselta ja aggregaatiolta.⁵ Ligandien tyyppi määrää myös kultananopartikkeleiden liukoisuuden ja sen, millaiset kemialliset reaktiot tai vuorovaikutukset ovat mahdollisia. Esimerkiksi difunktionaaliset tiolit, joiden toisessa päässä on jokin hydrofiilinen funktionaalinen ryhmä, mahdollistavat vesiliukoisten kultananopartikkeleiden valmistuksen.⁶

Ligandikuoren koostumukseen voidaan vaikuttaa lisäämällä erilaisia tioleja reaktioseokseen pelkistysprosessin yhteydessä⁷ tai suorittamalla ligandinvaihto pelkistysprosessin jälkeen⁸. Olemassa olevaa ligandikuorta voidaan myös muokata kemiallisesti antamalla uusien molekyylien reagoida kultananopartikkelin ytimestä pois päin suuntautuvien funktionaalisten ryhmien kanssa.⁹ Tämä onnistuu yleensä yksinkertaisilla orgaanisilla reaktioilla. Kultananopartikkeleiden kokoon voidaan yleisesti vaikuttaa vaihtelemalla reaktio-olosuhteita, kuten tetrakloorikultahapon ja ligandimolekyylien ainemäärien suhdetta, tetrakloorikultahapon ja pelkistimen välistä suhdetta tai reaktion lämpötilaa.¹⁰

Siirryttäessä bulkista metallista nanopartikkeleihin, kullin optiset ominaisuudet muuttuvat.¹¹ Kun kultananopartikkeleihin kohdistetaan sähkömagneettista säteilyä sopivalla aallonpituudella, delokalisoituneet johtovyön elektronit alkavat oskilloida saapuvan valon taajuudella kollektiivisesti suhteessa positiivisen ytimen tasoon. Tätä ilmiötä kutsutaan paikallistuneeksi pintaplasmoniresonanssiksi (LSPR). Ilmiön seurauksena kultananopartikkelit voivat säteillä niihin saapuvaa säteilyä edelleen ympäristöönsä tai absorboida saapuvan säteilyn, jolloin sen energia siirtyy vibraatioksi ja havaitaan yleensä lämpönä. LSPR-ilmiö riippuu muun muassa kultananopartikkeleiden koosta ja muodosta. Biologisten sovellusten kannalta on usein toivottavaa, että kultananopartikkelit absorboivat ja säteilevät säteilyä lähi-infrapuna-alueella (650–900 nm), koska kyseisen alueen säteily läpäisee hyvin kudoksia eikä

absorboitu merkittävästi veteen tai vereen. Osalla kultananopartikkeleista esiintyy myös luminesenssiominaisuuksia.¹² Tällöin kultananopartikkelin viritystilojen purkautumisessa vapautuva energia havaitaan näkyvänä valona.

1.1 Kultananopartikkeleiden biohyteensopivuus

Biologisissa systeemeissä tapahtuva kemia on evoluution optimoimaa, spesifistä ja tehokasta.⁵ Luonnon biokemiaa on osattu hyödyntää toistaiseksi vain rajoitetusti. Tutkimustyöllä pyritään kuitenkin jatkuvasti kehittämään uusia keinotekoisia, biomolekyylejä jäljitteleviä rakenteita, jotta biokemiaa voitaisiin näiden avulla manipuloida *in vivo*. Biologisten systeemien kemia on paitsi spesifistä myös äärettömän monimuotoista. Biokemia mahdollistaa tämän yhdistelemällä rakenteellisesti erilaisia molekyylejä erilaisia funktionaalisia ryhmiä omaavien molekyylien kanssa. Samaa lähestymistapaa voidaan hyödyntää molekulaaristen työkalujen suunnittelussa kiinnittämällä halutun funktionaalisen ryhmän omaavia biomolekyylejä tai niiden osia ominaisuuksiltaan halutunlaiseen keinotekoiseen runkorakenteeseen.

Kultananopartikkelit sopivat erinomaisesti runkorakenteeksi, sillä kulta itsessään on bioinertiä.¹¹ Lisäksi kultananopartikkeleiden kokoluokka voidaan säätää vastaamaan haluttujen biomolekyylien, kuten proteiinien, kokoluokkaa.⁵ Partikkeleiden koko vaikuttaa nanopartikkelin pinnan kaarevuuden kautta siihen, kuinka kuorikerroksen ligandit asettuvat avaruudellisesti.¹³ Orgaanisen ligandikerroksen koostumus ja orientaatio puolestaan määrittävät kultananopartikkeleiden funktionalisuuden ja biohyteensopivuuden.⁵ Ligandikerros voidaan suunnitella esimerkiksi siten, että kultananopartikkelit saadaan sitoutumaan selektiivisesti tiettyihin kohteisiin¹⁴ tai välttämään sitoutumista kokonaan¹⁵. Ligandikerrosta voidaan muokata lukuisilla eri tavoilla, sillä kultananopartikkeleihin pystytään liittämään lähes mikä tahansa orgaaninen molekyyli, jossa on vapaa tioli-, amiini- tai fosfiiniryhmä. Biohyteensopivien kultananopartikkeleiden valmistamiseksi kuorikerrokseen on mahdollista konjugoida esimerkiksi oligonukleotideja (DNA, RNA),¹⁶ sakkarideja,¹⁷ entsyymien kofaktoreita¹⁸ ja peptidejä¹⁹. Käytettäessä kultananopartikkeleita runkorakenteena etuna on myös se, että kultananopartikkeleiden pintaan voidaan sitoa useita erityyppisiä ligandeja samanaikaisesti.²⁰

Verrattaessa tasomaiseen kultapintaan ja kultananopartikkeleihin kiinnitettyjen orgaanisten ligandien sitoutumista vasta-aineisiin on todettu, että nanopartikkeleiden pinnan kaarevuus mahdollistaa ligandien asettumisen biologisesti mielekkäisiin konformaatioihin, jotka ovat lähempänä biomolekyylien luonnollisia konformaatioita kuin tasomaiseen pintaan kiinnitettyjen ligandien konformaatiot.²¹ Toisin sanoen kultananopartikkelit edesauttavat muotonsa puolesta biomolekyylien ja ligandien välistä tunnistusta. Pinnan kaarevuuteen voidaan vaikuttaa säätämällä kultananopartikkeleiden kokoa.

Kultananopartikkeleiden koko vaikuttaa myös esimerkiksi siihen, miten hyvin kultananopartikkelit erittyvät munuaisten kautta. On arvioitu, että nanopartikkeleiden tulisi olla hydrodynaamiselta halkaisijaltaan alle viisi nanometriä, jotta ne pystyvät poistumaan kehosta nopeasti virtsateitse.²² Toisaalta verrattain suuren koon on havaittu edistävän kultananopartikkeleiden pääsyä sisälle soluun reseptorivälitteisen endosytoosin kautta. Korrelaatio koon ja reseptorivälitteisen endosytoosin tehokkuuden välillä ei kuitenkaan ole lineaarinen, vaan endosytoosin on havaittu olevan tehokkainta halkaisijaltaan noin 50 nm olevien kultananopartikkeleiden kohdalla.²³ Myös eksosytoosi on kultananopartikkeleiden koosta riippuva prosessi, joka tehostuu nanopartikkeleiden halkaisijan pienentyessä.²⁴

Kultananopartikkeleiden koko ja orgaaninen ligandikerros vaikuttavat yhdessä siihen, kuinka kehon retikuloendoteelinen systeemi reagoi nanopartikkeleihin. Oponisaatio on prosessi, jossa plasmaproteiinit, pääasiassa immunoglobuliinit ja komplementtijärjestelmän proteiinit, tarttuvat injektoidun nanopartikkelin pintaan, aktivoivat komplementtijärjestelmän ja houkuttelevat paikalle retikuloendoteelisen järjestelmän (RES) syöjäsoluja, jotka poistavat nanopartikkelit verenkierrosta.²⁵ Tämä voi tapahtua muutamien minuuttien aikana, jolloin nanopartikkeleilla ei ole aikaa saavuttaa kehonsisäistä kohdettaan. Nanopartikkeleiden orgaaninen ligandikerros voi kuitenkin suojata nanopartikkeleita plasmaproteiinien kiinnittymiseltä. Tavallisin käytetty suojausligandi on polyetyleeniglykoli (PEG). PEG on neutraali, hydrofiilinen polymeeri, joka ehkäisee oponisaatiota steerisen repulsion kautta. Tutkimuksissa on myös havaittu, että pienikokoiset kultananopartikkelit välttävät retikuloendoteelisen järjestelmän syöjäsolut suurikokoisia kultananopartikkeleita paremmin.²⁶ Tämän arvellaan selittyvän sillä, että pienemmissä partikkeleissa suojaava ligandikerros on tiheämpi.

1.2 Kultananopartikkelit lääkeaineiden kuljetuksessa

Lääketieteellisissä sovelluksissa on usein tavoitteena kuljettaa jokin lääkeainemolekyylitai merkkiaine soluun. Mitä spesifisemmin lääkeaine saadaan kulkeutumaan haluttuun kohteeseen, sitä vähemmän sivuvaikutuksia lääkkeellä on. Antibakteeristen agenttien tai syöpälääkkeiden lopullinen kohde saattaa olla esimerkiksi tumassa sijaitseva DNA, johon sitoutuessaan lääkeaine estää proteiinisynteesin ja tappaa solun.^{27a} Tällöin halutaan välttää lääkeaineen kulkeutumista terveisiin soluihin.

Kohdennettu kuljetus tapahtuu käyttämällä ligandeja, jotka vuorovaikuttavat spesifisesti tiettyjen kohteiden kanssa. Mikäli kohteena on syöpäkudos, ligandi voidaan suunnitella tunnistamaan tiettyjä, syöpäsolujen solukalvolla tavallista runsaampana esiintyviä reseptoreita.¹⁴ Vuorovaikutus reseptorien kanssa laukaisee endosytoosin, jonka kautta lääkeaine pääsee soluun.

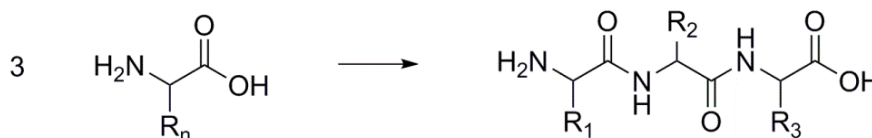
Kohteeseen ohjaavien ligandien liittäminen suoraan lääkeainemolekyyliin ei yleensä ole mahdollista, sillä lääkeaineet ovat usein pieniä molekyylejä, joiden jokainen funktionaalinen ryhmä on tärkeä niiden toiminnalle.^{27b} Näin ollen ylimääräisten osien liittäminen muuttaa väistämättä lääkeaineen farmakokineettisiä ominaisuuksia. Mikäli kohdentava ligandi ei määränpäänsä saavutettuaan kykene vapauttamaan alkuperäistä lääkeainemolekyylitai, se saattaa myös vaikuttaa lääkeaineen farmakodynaamisiin ominaisuuksiin ja jopa estää lääkeainetta sitoutumasta kohteeseensa.

Lääkeainemolekyylitai ongelmana saattaa olla myös se, että ne eivät pysty saavuttamaan esimerkiksi solun tumassa sijaitsevaa kohdettaan kokonsa tai varauksensa vuoksi.²⁸ Lisäksi soluissa on niin kutsuttuja P-glykoproteiineja, jotka pumppaavat pieniä lääkeainemolekyylejä ulos soluista. Ratkaisuna ongelmiin pyritään kehittämään erilaisia kuljetusalustoja, joiden avulla lääkeainemolekyylitai saavuttaa kohteensa paremmin.

Kultananopartikkeleita voidaan käyttää alustana lääkeaineiden kuljetuksessa. Tällöin lääkeaine-kultananopartikkelikonjugaatin farmakokineettiset ominaisuudet riippuvat ensisijaisesti kultananopartikkelin ja sen kuorikerroksen ominaisuuksista, joten ne ovat helposti kontrolloitavissa. Stabiiloivan ligandin joukkoon voidaan hallitussa suhteessa lisätä kohteeseen ohjaavia ligandeja.²⁹ Nämä voivat olla esimerkiksi vasta-aineita³⁰ tai tietyn aminohapposekvenssin omaavia peptidejä²⁹. Kultananopartikkeleiden suuri pinta-ala suhteessa tilavuuteen mahdollistaa myös sen, että yksi partikkeli pystyy kuljettamaan useita lääkeainemolekyylejä kerralla.

2. Oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit

Oligopeptidit, joihin kirjallisuudessa viitataan usein myös pelkällä peptidi-termillä, koostuvat karkeasti määritellen 2–20 aminohaposta, jotka kytkeytyvät toisiinsa peptidisidoksella (kuva 1). Rakenne vastaa proteiinien sekundäärirakennetta. Peptidien käyttö orgaanisina ligandeina kultananopartikkeleiden päällystyksessä on ollut suosittua, koska lukuisat soluissa tapahtuvat prosessit perustuvat proteiinien toimintaan.⁵ Lisäksi aminohapoista kysteiini sisältää tioliryhmän, jolla kysteiinin sisältävä synteettinen aminohappoketju voidaan kiinnittää kultananopartikkeliin. Koska oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit muistuttavat proteiineja, niitä voidaan manipuloida ja puhdistaa alun perin proteiinien käsittelyyn optimoiduilla menetelmillä.³¹ Esimerkiksi IMAC-kromatografiaa, jota normaalisti käytetään rekombinanttiproteiinien puhdistukseen, voidaan käyttää erottelemaan myös oligopeptidipäällysteisiä nanopartikkeleita.



Kuva 1. Tripeptidin muodostuminen kolmesta aminohaposta. R_n ($n = 1, 2, 3$) kuvaa aminohapon sivuketjua.

Oligopeptidit ovat lupaavia ligandeja erityisesti kohdennetussa lääkeaineiden kuljetuksessa, jossa tavoitteena on saattaa lääkeaine spesifisesti tiettyyn kohteeseen kehossa.³² Kohdennettuun lääkeaineiden kuljetukseen sopivia ligandeja ovat oligopeptidien ohella esimerkiksi vasta-aineet, proteiinit ja hiilihydraatit. Vasta-aineisiin ja proteiineihin verrattuna oligopeptidien etuna on niiden pieni koko. Lisäksi oligopeptidien valmistaminen kemiallisesti on suhteellisen helppoa. Niiden aminohapposekvenssi voidaan määrittää vastaamaan spesifisesti tiettyä reseptoria. Sekvenssi on myös helposti muunneltavissa tarpeen mukaan ja siihen voidaan liittää uusia funktionaalisia ryhmiä. Tavallisesti oligopeptideillä on myös alhainen toksisuus.

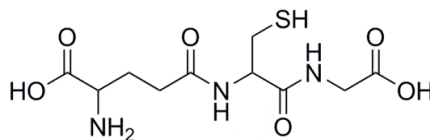
Oligopeptidipäällysteisiä kultananopartikkeleita voidaan valmistaa muun muassa ligandinvaihdon kautta. Esimerkiksi sitraattimolekyyleillä stabiloitujen

kultananopartikkeleiden kuorirakenteeseen saadaan nopeasti vaihdettua oligopeptidejä yksinkertaisesti sekoittamalla kultananopartikkeli- ja oligopeptidiliuokset keskenään mikäli oligopeptidi sisältää N-terminaalisen kysteiinin.³³ Lyhyitä alkaanitioleja tutkittaessa on havaittu, että positiivisesti varautuneet merkaptoetyyliamiinit adsorboituvat kultananopartikkeleiden pintaan nopeammin kuin negatiivisesti varautuneet merkaptopropanisulfonaatit.³⁴ Vastaavasti oligopeptidin aminoryhmän positiivisen varauksen ja kultananopartikkeleiden pinnan negatiivisen varauksen välinen vetovoima edistää oligopeptidien nopeaa kiinnittymistä kultananopartikkeleihin.

Oligopeptidit itsessään voidaan valmistaa kiinteä faasi -menetelmällä, jossa aminohappoketju kasvatetaan aminohappo kerrallaan ketjun toisen pään ollessa kiinnitettynä hartsiin.³⁵ Menetelmä mahdollistaa yksilöityjen oligopeptidien helpon ja nopean synteesin mitä tahansa oligopeptideihin liittyvää sovellusta varten.

2.1 Glutationipäällysteiset kultananopartikkelit

Glutathioni (GSH) on glutamiinihapon, kysteiinin ja glysiinin muodostama tripeptidi, jossa glutamiinihappo on liittynyt sivuketjunsä karboksyyli-ryhmän kautta gammapeptidisidoksella kysteiinin aminoryhmään (kuva 2). Glutathioni on yksi yleisimmistä kultananopartikkeleiden biofunktionalisoimiseen käytetyistä oligopeptideistä. Se on myös yleisin luonnollisesti *in vivo* esiintyvä tioli.



1

Kuva 2. Glutationin rakenne

Kultananopartikkeleiden kuorikerroksen muokkauksessa hyödynnettävää ligandinvaihtoilmiötä tapahtuu myös kontrolloimattomasti *in vivo* tutkimuksissa.⁵ Tällöin kehossa luonnollisesti esiintyvät tiolimolekyylit vaihtavat paikkaa

kultananopartikkeleiden tioliligandien kanssa muuttaen partikkeleiden kuorikerroksen koostumusta. Runsautensa vuoksi ligandinvaihtoon osallistuva tioli on yleensä glutationi. Osa nanopartikkeleiden sovelluksista on suunniteltu hyödyntämään kyseistä ilmiötä,³⁶ mutta yleensä ennalta suunnitellun kuorikerroksen muokkautuminen *in vivo* on epätoivottavaa. Jos kultananopartikkelit päällystetään glutationilla, tämä tekee *in vivo* tapahtuvan ligandinvaihdon merkityksettömäksi. Tällaisiin bioinerteihin glutationipäällysteisiin kultananopartikkeleihin voidaan edelleen konjugoida haluttuja funktionaalisuuksia.

Glutationi nähdään myös potentiaalisena vaihtoehtona lääketieteellisiin sovelluksiin tarkoitettujen kultananopartikkeleiden suojauksessa perinteisesti käytetylle PEG:lle.³⁷ PEG:n on osoitettu vähentävän nanopartikkeleiden toksisuutta,³⁸ suojaavan partikkeleita epäspesifiseltä plasmaproteiinien absorptiolta²⁵ ja pidentävän nanopartikkeleiden kiertoaikaa verenkierrossa,³⁸ mutta samalla se heikentää nanopartikkelin vuorovaikutusta proteiinirakenteisten kohteiden, kuten solukalvon reseptoreiden kanssa.

Glutationimolekyylissä on sekä karboksyyli- että amiiniryhmä. Koska kahtaisionien tiedetään vähentävän epäspesifistä proteiiniabsorptiota, on arveltu, että myös glutationi voisi ehkäistä opsonisaatiota ja siten kätkeä kultananopartikkelin PEG:n tapaan kehon retikuloendoteeliselta järjestelmältä.³⁷ Zhou *et al.*³⁹ osoittivat, että noin kahden nanometrin kokoisilla glutationipäällysteisillä kultananopartikkeleilla maksaan kertynyt osuus oli vain 3 % ID/g 48 tuntia injektion jälkeen. Tyypillisesti maksa poistaa suurimman osan biohajoamattomista partikkeleista, joten glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden alhainen kertymä maksaan tulkittiin merkiksi siitä, että kultananopartikkeleiden glutationipäällystyksen vähentää epäspesifistä RES-absorptiota.

Toisessa tutkimuksessa osoitettiin, että glutationilla ja yksinkertaisimmalla alkaanitiolilla, kysteamiinilla, stabiloitujen kultananopartikkeleiden adsorptio elävien solujen pintaan riippui ympäristön pH:sta.⁴⁰ Tämä on epätyypillistä useimmille kultananopartikkeleille, sillä tavallisesti plasmaproteiinien muodostama proteiinikorona tekee kultananopartikkeleista epäherkkiä solunulkoisen tilan pH:n vaihteluille.⁴¹ Yun *et al.*⁴⁰ tutkimuksessa kultananopartikkeleiden pH-riippuvainen absorptio solukalvon pintaan perustui kysteamiinin aminoryhmään, joka protonoituaan saa positiivisen varauksen ja pystyy siten vuorovaikuttamaan negatiivisesti varautuneen solukalvon kanssa. Tutkimuksessa kysteamiinilla päällystetyt kultananopartikkelit saivat plasmaproteiinien läsnä ollessa negatiivisen varauksen, mutta glutationimolekyylien

lisääminen kuorikerrokseen esti plasmaproteiinien kiinnittymisen mahdollistaen kultananopartikkeleiden pH-herkän absorption HeLa-solujen solukalvolle.

2.1.1 Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden biojakautuminen ja toksisuus

Glutationipäällysteisillä kultananopartikkeleilla ei ole havaittu olevan merkittäviä toksisia vaikutuksia hiirille.^{5,37,42} Tutkittaessa halkaisijaltaan 1.2 nm olevia oligopeptidipäällysteisiä kultananopartikkeleita aina 60 μM :n konsentraatioon ($V = 200 \mu\text{l}$) saakka havaittiin, että yli 30 % partikkeleista erittyy virtsateitse tunnin sisällä injektioista. Tämä viittaa siihen, että oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit pääsevät helposti munuaisiin eivätkä kuormita virtsanerityselimistöä konsentraation kasvaessa. Toisessa tutkimuksessa todettiin, että yli puolet halkaisijaltaan noin 2 nm olevista glutacionipäällysteisistä kultananopartikkeleista poistui virtsan mukana hiirten elimistöä 24 tunnin sisällä injektioista.³⁹ 72 tunnin jälkeen injektoiduista partikkeleista oli poistunut 65 %. Vastaavaa glutacionipäällysteisten kultananopartikkeleiden tehokasta erittymistä munuaisten kautta on havaittu myös muissa tutkimuksissa.⁴²

Oligopeptidipäällysteisten, halkaisijaltaan 1.2 nm olevien kultananopartikkeleiden biojakautumista selvitetessä havaittiin, että partikkelit kerääntyvät ensimmäisen 24 tunnin sisällä injektioista erityisesti munuaisiin ja keuhkoihin, mutta neljän viikon kuluttua suurimmat konsentraatiot mitattiin maksasta ja pernasta.³⁷ Kultananopartikkeleiden oletettiin vähentyneen muista elimistä retikuloendoteelisen systeemin toiminnan kautta. Samassa tutkimuksessa selvitettiin myös, aiheuttavatko glutacionipäällysteiset kultananopartikkelit immuunivasteen. Immuunivasteesta kertovia tilastollisesti merkittäviä muutoksia puna- ja valkosolujen suhteissa havaittiin vasta vahvimalla 60 μM konsentraatiolla ($V = 200 \mu\text{l}$). Alhaisemmilla konsentraatioilla immuunivastetta ei syntynyt.

Toisessa biojakautumista selvittävässä tutkimuksessa kahden nanometrin kokoluokkaa olevista glutacionipäällysteisistä kultananopartikkeleista vain 4.4 % kertyi keuhkoihin 24 tunnin sisällä injektioista.³⁹ Maksassa vastaava kertymä oli 3.7 %, munuaisissa 8.8 %, ja pernassa 0.3 %. Kaiken kaikkiaan glutacionipäällysteisten kultananopartikkeleiden kertyminen erityisesti maksaan oli vähäistä verrattuna esimerkiksi halkaisijaltaan 1.4 ja

18 nm kultananopartikkeleihin, joille vastaavat kertymät olivat 48 ja 94 %.⁴³ Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden biojakautumisen osoitettiin myös riippuvan kultananopartikkeleiden koosta. 24 tunnin kuluttua injektioista 4 % halkaisijaltaan kuusi nanometriä olevista kultananopartikkeleista löytyi virtsasta ja 27 % maksasta, kun taas 13 nm kultananopartikkeleista virtsaan päätyi samassa ajassa 0.5 % ja maksaan 40.5 %. Tulosten mukaan munuaisten kautta tapahtuvan erittymisen tehokkuus heikkeni eksponentiaalisesti kultananopartikkeleiden koon kasvaessa. Koon kasvaessa myös partikkeleiden fysiologinen stabiilisuus seerumiproteiinien läsnä ollessa heikkeni viitaten siihen, että glutacionipäällysteisten kultananopartikkeleiden vuorovaikutukset seerumin proteiinien kanssa riippuvat partikkelin koosta.

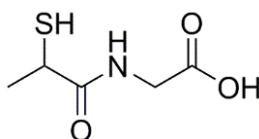
Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden verenkierrosta poistumisen puoliintumisajaksi mitattiin eräässä tutkimuksessa 8.5 tuntia.⁴⁴ Suhteellisen pitkä kiertoaika selittyy osin sillä, että glutacionipäällystys suojaa kultananopartikkeleita RES-järjestelmän syöjäsoluilta. Vaikka veressä olevat entsyymit tyypillisesti hajottavat pieniä peptidejä, glutacionipäällysteisten kultananopartikkeleiden on osoitettu olevan vastustuskykyisiä myös entsyymaattiselle hajotukselle.³⁹

2.1.2 Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden sovellukset

Glutationipäällysteisiä kultananopartikkeleita on hyödynnetty muun muassa virustutkimukseen, syöpähoitoon ja lääketieteelliseen kuvantamiseen liittyvien sovellusten suunnittelussa. Yksi kultananopartikkeleille kaavailtu sovellus on niiden käyttö virusten korvikkeina lääketieteellisessä tutkimustyössä. Tällöin kultananopartikkeleiden pintaan kiinnitetään antigeeni, jonka kehon vasta-aineet tunnistavat. Tavoitteena on välttää virusten käyttöön liittyviä riskejä ja vähentää erityisten turvatoimien aiheuttamia kustannuksia.

Konseptin toimivuuden osoittamiseksi Gerdon *et al.*¹⁹ päällystivät halkaisijaltaan alle kolme nanometriä olevia kultananopartikkeleita glutacionilla ja seurasivat partikkeleiden sitoutumista QCM-siruun kiinnitettyihin anti-glutacioni vasta-aineisiin. Kontrollina tutkimuksessa käytettiin tioproniinilla (kuva 3) päällystettyjä kultananopartikkeleita, jotka eivät ligandimolekyylien samankaltaisuudesta huolimatta sitoutuneet vasta-aineisiin. Näin ollen glutacionipäällysteisten kultananopartikkeleiden sitoutumisen

katsottiin olevan spesifistä. Jatkotutkimuksissa peptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden spesifinen sitoutuminen vasta-aineisiin saatiin aikaan myös influenssan hemagglutiniini proteiinista kopioidun kymmenen aminohapon oligopeptidiepitoopilla, joka kiinnitettiin tioproniinilla suojattujen kultananopartikkeleiden pintaan ligandinvaihdolla oligopeptidin päässä olevan kysteiinin vapaata tioliryhmää hyödyntäen.²¹



2

Kuva 3. Tioproniinin rakenne

Toinen glutationipäällysteisille kultananopartikkeleille kaavailtu sovellus on niiden käyttö syövän sädehoidon tehostamisessa.⁴² Sädehoito on suoraviivainen kiinteiden kasvaimien alustava hoitokeino, jossa kohdetta säteilytetään ionisoivalla sähkömagneettisella säteilyllä. Tavoitteena on tappaa syöpäsoluja ja siten hillitä syöpäkudoksen kasvua. Tehokkaita kehonulkoisia säteilylähteitä käytettäessä tarvittava säteilyannos voidaan tuottaa nopeasti, mutta ongelmana on kohdetta ympäröivän terveen kudoksen samanaikainen altistuminen säteilylle.

Kultananopartikkeleiden käyttö sädehoidon tehostajina perustuu niiden vuorovaikutukseen säteilyn kanssa.⁴⁵ Kun kultananopartikkeleita säteilytetään, ne muuttuvat uusiksi säteilylähteiksi ja emittoivat ympäristöönsä korkeaenergistä säteilyä, joka saa aikaan vapaiden radikaalien muodostumista ja ionisoitumista kudoksessa. Laskelmien mukaan kultananopartikkelit voivat kasvattaa paikallista säteilyannosta syöpäkudoksessa jopa yli 200 % verrattuna syöpäkudoksen vastaanottamaan säteilyannokseen ilman kultananopartikkeleita. Tämän ansiosta kultananopartikkeleilla tehostetussa sädehoidossa voidaan käyttää pienempiä säteilyannoksia ilman, että hoidon teho kärsii. Samalla minimoidaan terveelle kudokselle aiheutuvat vauriot.

Zhang *et al.*⁴² selvittivät alle kahden nanometrin kokoluokkaa olevien Au₂₉₋₄₃(SG)₂₇₋₃₇ klustereiden toimintaa syövän sädehoidon tehostajina. Hiirillä tehdyissä tutkimuksissa

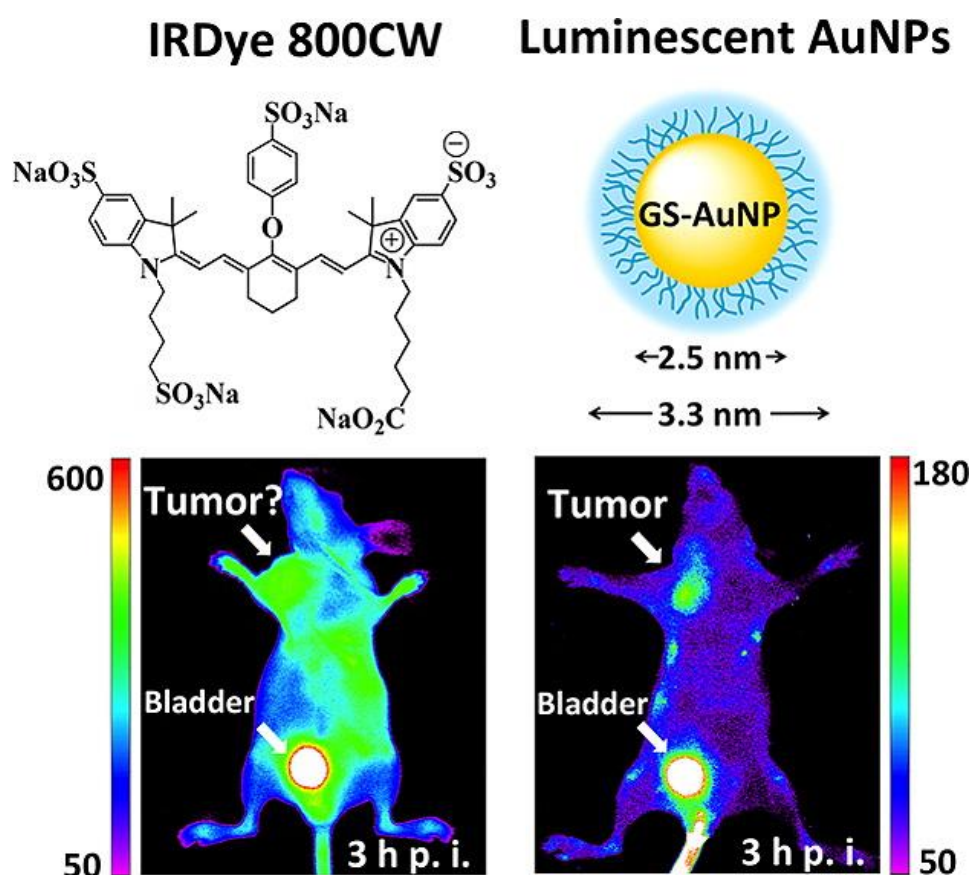
8.1 % injektoidusta annoksesta päätyi 24 tunnin kuluessa syöpäkasvaimiin. Kullan konsentraatio kasvaimissa verrattuna konsentraatioon munuaisissa oli 2.1/1.0, 4.5/1.0 verrattuna konsentraatioon veressä ja 14.2/1.0 verrattuna konsentraatioon maksassa. Klustereiden pienen koon ajateltiin vähentäneen plasmaproteiinien absorptiota ja mahdollistaneen retikuloendoteelisen systeemin välttämisen, jonka seurauksena suurempi osa klustereista kertyi syöpäkudokseen eikä esimerkiksi pernaan, maksaan, sydämeen tai keuhkoihin. Verrattuna hiiriin, joiden syöpää hoidettiin pelkällä sädehoidolla, $Au_{29-43}(SG)_{27-37}$ annostuksen saaneiden hiirien syöpäkasvaimen koko pieneni 66 %.

Yleisesti tiedetään, että partikkeleiden kulkeutumista syöpäkudokseen edistää niin kutsuttu tehostunut permeabilitetti ja retentio -efekti (enhanced permeability and retention, EPR), joka johtuu syöpäkudoksen epänormaalista verisuonituksesta. Syöpäsolut jakautuvat terveitä soluja nopeammin. Tämän seurauksena kasvaimen koko kasvaa nopeasti ja sen sisäosat jäisivät vaille energiaa, elleivät syöpäsolut erittäisi uusien verisuonten kasvua stimuloivia kasvutekijöitä. Syöpäkudoksen kasvattamien verisuonien endoteeliset solut eivät kuitenkaan yleensä järjesty normaalisti vaan jättävät verisuonien seinämät huokoisiksi. Tällöin tietynkokoiset nanopartikkelit läpäisevät verisuonien seinämät helposti ja kulkeutuvat syöpäkudokseen. Lisäksi syöpäkasvaimista puuttuu toimiva imusuonisto, joka normaalisti poistaisi nanopartikkeleita kudoksesta. Jotta tietyn ligandimolekyylin edesauttavasta roolista kultananopartikkeleiden kulkeutumisessa syöpäkudokseen voitaisiin varmistua, tulisi samaa kokoluokkaa olevia, mutta eri ligandilla stabiloituja kultananopartikkeleita verrata keskenään.

Koska tietyn tyyppisillä kultananopartikkeleilla esiintyy luminesenssi-ilmiötä, niitä voidaan EPR-efektin kautta hyödyntää myös syövän diagnosoinnissa ja kuvantamisessa. Jotta EPR-efekti toimisi tehokkaasti, nanopartikkeleiden konsentraation verenkierrassa tulisi säilyä suhteellisen korkeana vähintään kuusi tuntia.⁴⁶ Tämä ei yleensä ole ongelmana nanopartikkeleilla, joiden koko ylittää 40 kDa tai 5.5 nm, sillä nämä partikkelit eivät suodatu helposti munuaisten kautta. Lääketieteellisissä sovelluksissa nanopartikkeleiden pieni koko on kuitenkin usein toivottua, sillä ne välttävät retikuloendoteelisen systeemin suuria partikkeleita paremmin. Toisaalta merkkiaineen halutaan myös poistuvan kehosta ongelmitta käytön jälkeen.

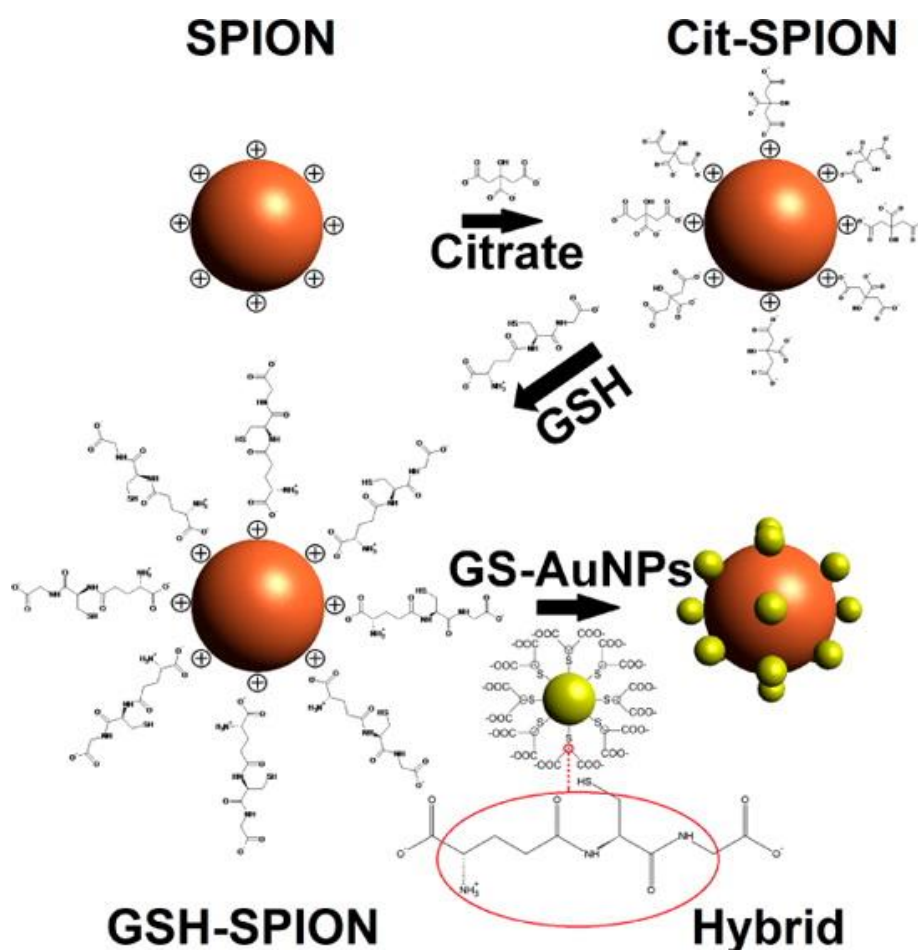
Liu *et al.*⁴⁴ selvittivät, kuinka hyvin EPR-efekti toimii pienillä halkaisijaltaan 2.5 nm olevilla glutationipäällysteisillä kultananopartikkeleilla vertaamalla niitä orgaaniseen fluoroforimolekyylin IRDye 800CW15:ta (Kuva 4). Hiirillä suoritetussa tutkimuksessa

todettiin, että 12 tunnin kuluttua injektiosta glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden konsentraatio syöpäkasvaimessa oli kymmenen kertaa suurempi kuin fluoroforin. Samanaikaisesti kultananopartikkelit poistuivat terveestä kudoksesta yli kolme kertaa nopeammin kuin fluoroformolekyylit. Glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden avulla syöpäkasvaimet olivat havaittavissa jo kolmen tunnin kuluttua injektiosta (kuva 4), mutta IRDye 800CW -fluoroforilla kesti viisi tuntia pidempään poistua terveistä kudoksista paljastaen kasvaimet. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että huolimatta pienestä koosta ja tehokkaasta erittymisestä munuaisten kautta glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden konsentraatio verenkierrossa pysyy EPR-efektin kannalta riittävän korkeana ja ne soveltuvat paremmin syövän nopeaan havaitsemiseen kuin orgaaniset merkkiaineet.



Kuva 4. IRDye 800CW -fluoroforin ja glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden yleinen rakenne ja sijainti hiiren kehossa kolme tunnin kuluttua injektiosta. Adapted with permission from J. Am. Chem. Soc., 2013, 135 (13), pp 4978–4981. Copyright 2013 American Chemical Society.

Eräs glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden epäsuorasovellus on niiden kiinnitys superparamagneettisten rautaoksidinanopartikkeleiden (SPION) pintaan suojaamaan partikkeleita plasmaproteiinin epäspesifiseltä absorptiolta.⁴⁷ SPION:t ovat nanopartikkeleita, joita voidaan niiden magneettisten ominaisuuksien ansiosta ohjata tiettyyn kohteeseen ulkoisten magneettien avulla.⁴⁸ Kun ulkoinen magneettikenttä poistetaan, myös SPION:den magneettinen vuorovaikutus häviää. Vinluan *et al.*⁴⁷ suunnittelivat glutationipäällysteisten kultananopartikkeleiden ja glutationipäällysteisten SPION:den hybridinanopartikkelin, jossa glutationimolekyylit toimivat kultananopartikkeleiden ja SPION:den välisenä linkkinä. Glutatonimolekyylien negatiivisesti varautuneet karboksylaattiryhmät vuorovaikuttavat positiivisesti varautuneen SPION:n pinnan kanssa vapaiden tioliryhmien sitoutuessa kultananopartikkeleiden pintaan (kuva 5).



Kuva 5. Hybridinanopartikkelin valmistus sitraattipäällysteisestä SPION:sta. Reprinted with permission from ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014, 6 (15), pp 11829–11833.

Tutkimuksissa havaittiin, että glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden tarjoama suoja vähensi plasmaproteiinien absorptiota *in vitro* noin kymmenen kertaa enemmän kuin pelkän glutationin käyttö SPION:den päälystyksessä.⁴⁷ Lisäksi glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden kiinnitys lisäsi SPION:den fysiologista stabiilisuutta. Glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden kiinnittäminen SPION:hin kasvatti alun perin noin yhdeksän nanometrin luokkaa olleiden partikkeleiden hydrodynamista halkaisijaa alle viisi nanometriä.

SPION:den ja glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden yhdistämisessä yhdeksi hybridinanopartikkeliksi etuna on myös se, että tällöin SPION:den magneettisia ominaisuuksia ja kultananopartikkeleiden fluoresenssi-ominaisuuksia voidaan hyödyntää yhtäaikaisesti. Vinluan *et al.*⁴⁷ osoittivat, että hybridinanopartikkeleiden fluoresenssin intensiteetti oli puolet heikompi kuin glutationipäälysteisillä kultananopartikkeleilla. Toisaalta glutationipäälysteiset SPION:t eivät yksinään ole lainkaan fluoresoivia. Glutationipäälysteisten SPION:den ja hybridinanopartikkeleiden magneettisia ominaisuuksia verrattaessa molempien partikkeleiden todettiin olevan huoneenlämmössä superparamagneettisia. Myös molempien partikkeleiden magnetisaatio oli samaa suuruusluokkaa.

Yksi glutationin monista rooleista solussa on toimiminen biologisena antioksidanttina, joka suojaa solua vapailta happiradikaaleilta ja peroksideilta.⁴⁹ Tästä ominaisuudesta kiinnostuneina Pongsuchart *et al.*⁵⁰ selvittivät glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden vaikutuksia 3T3-fibroblastisolujen kykyyn tuottaa reaktiivisia happiyhdisteitä. Tutkimuksessa havaittiin, että vetyperoksidin muodostuminen glutationipäälysteisten kultananopartikkeleiden kanssa inkuboiduissa soluissa oli vähäisempää kuin pelkän glutationin tai natriumboorihydriinillä stabiloitujen kultananopartikkeleiden kanssa inkuboiduissa soluissa. Tutkimus toistettiin useissa eri konsentraatioissa, joista kaikissa vetyperoksidin muodostuminen väheni lineaarisesti inkuboinnin keston pidentyessä. Tulokset osoittavat, että glutationipäälysteisiä kultananopartikkeleita voitaisiin mahdollisesti hyödyntää myös happiradikaalien määrän säätelyyn liittyvissä lääketieteellisissä sovelluksissa.

2.2 Soluun ja tumaan ohjaavat oligopeptidit kultananopartikkeleiden päällystyksessä

Soluun ohjaavat oligopeptidit ovat tyypillisesti aminohapposekvenssejä, jotka vuorovaikuttavat jonkun solukalvolla sijaitsevan reseptorin kanssa.⁵¹ Tarkoituksena on laukaista reseptorivälitteinen endosytoosi, jonka kautta kultananopartikkeli saadaan sisälle soluun. Endosytoosissa solukalvo kuroutuu vieraan partikkelin ympäri muodostaen endosomiksi kutsutun vesikkelin, joka irtoaa solukalvosta sytosoliin partikkeli mukanaan. Solunsisäisessä liikenteessä endosomit yhdistyvät lysosomeihin, jotka pitävät sisällään hydrolyyttisiä entsyymejä. Näiden entsyymien tarkoituksena on pilkkoa soluihin saapuvia biomolekyylejä, kuten proteiineja, nukleiinihappoja, hiilihydraatteja ja rasvoja. Lisäksi lysosomien entsyymit vastaavat vaurioituneiden ja toimimattomien soluelimien hajotuksesta. Jotta soluun kuljetettu lääkeainemolekyyli välttäisi entsyymattisen hajotuksen, sitä kuljettavan kultananopartikkelin täytyy solukalvon läpäisyn ohella kyetä vapautumaan myös endosomeista tai lysosomeista.

Tiettyjen sovellusten kohdalla kultananopartikkelit halutaan saattaa solun tumaan. Tuman saavuttaminen on tärkeää erityisesti syöpähoidoissa, joihin sisältyy DNA:n kanssa vuorovaikuttavien lääkkeiden käyttöä. Myös hoidot, joissa solun proteiinisynteesiin pyritään vaikuttamaan häiritsemällä lähetti-RNA:n toimintaa, perustuvat pienien häiritsevien RNA-molekyylien (siRNA) kuljetuksen solun tumaan.

Tumaan ohjaavat oligopeptidit ovat aminohappoketjuja, jotka vuorovaikuttavat tumahuokoseksi kutsutun, solun tumakalvossa sijaitsevan proteiinirakenteen kanssa.⁵² Tumahuokonen mahdollistaa molekyylien kulkeutumisen tuman ja solulinjan välillä. Sen halkaisija vaihtelee 20 nanometristä 50 nanometriin solulinjasta riippuen, joten mahtuakseen kulkeutumaan rakenteen läpi oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden halkaisijan tulisi olla näissä rajoissa.

Virukset ovat luonnostaan erikoistuneet tunkeutumaan solun tumaan.⁵² Ne voivat kantaa pinnallaan useita eri peptidejä, joiden tarkoituksena on avustaa virusta läpäisemään kaikki solun kalvorakenteet. Kultananopartikkeleiden päällystyksessä on tutkittu erityisesti adenoviruksen kuituproteiinista johdettuja sekvenssejä CKKKKKSEDEYPYVPN ja CGGFSTSLRARKA, joita virus käyttää hyödykseen tunkeutuessaan soluun.²⁹ Muita tutkimuksissa hyödynnettyjä oligopeptidejä ovat SV40 iso T -antigeenin tumaan ohjaava signaali CGGGPKKKRKVGG ja HIV-1 Tat -proteiinin tumaan ohjaava signaali CGGRKKRRQRRRAP.²⁸ HIV-1 Tat -proteiinin

RKKRRQRRR-sekvenssi aloittaa HI-viruksen genomien transkription ja sen on myös todettu edesauttavan solukalvon läpäisyä.⁵³ Solukalvolle ja tumaan ohjaavia oligopeptidejä on listattu taulukossa 1.

Taulukko 1. Solukalvon reseptoreihin ja tumaan kohdennettaessa käytettäviä oligopeptidejä.

Sekvenssi	Alkuperä	Toiminta
CGGGPKKKRKVGG	SV40 iso T	tumaan ohjaava signaali
CGGRKKRRQRRRAP	HIV-1 Tat	tumaan ohjaava sekvenssi
CGGFSTSLRARKA	adenovirus	tumaan ohjaava sekvenssi
CKKKKKKSEDEYPYVPN	adenovirus	reseptorivälitteinen endosytoosi
CKKKKKKKSEDEYPYVPN-FSTSLRARKA	adenoviruksen kuituproteiini	

Yhdessä varhaisimmista kultananopartikkeleiden tumakalvonläpäisykykyä käsittelevistä tutkimuksista Feldherr ja Akin⁵⁴ käyttivät BSA-päällysteisiä kultananopartikkeleita, joihin oli liitetty viruksen SV40 iso T -antigeenin tumaan ohjaava signaali. Kyseisen oligopeptidin KKKRK-sekvenssin on osoitettu sitoutuvan importin- α -proteiiniin, joka sitoutuu edelleen importin- β -proteiiniin ja läpäisee tumakalvon tumahuokosen kautta.²⁸

Feldherrin tutkimukset suoritettiin injektoimalla kultananopartikkelit suoraan HeLa-solujen solulimaan. Jotta kultananopartikkelit olisivat mielekkäitä biologisten sovellusten kannalta, niiden tulisi kuitenkin kyetä läpäisemään myös solukalvo esimerkiksi reseptorivälitteisen endosytoosin kautta. Kun Tkachenko *et al.*⁵² myöhemmin toistivat kokeen lisäämällä SV40 iso T -antigeenin tumaan ohjaavalla signaalilla funktionalisoidut kultananopartikkelit koskemattomien HepG2-solujen kasvatusmediaan, havaittiin, että kultananopartikkelit läpäisivät solukalvon, mutta ne jäivät solulimaan. Tämän arveltiin johtuvan siitä, että kultananopartikkelit eivät kyenneet vapautumaan endosomeista, joihin ne endosytoosin seurauksena päätyivät. Kyseiset kultananopartikkelit eivät myöskään saavuttaneet 3T3/NIH-solujen tumaa kuuden tunnin inkuboinnin aikana.²⁸

Kun kokeet toistettiin HeLa-soluilla, havaittiin, että kultananopartikkelit poistuivat endosomeista ja kasaantuivat 2–3 tunnin inkuboinnin jälkeen tumakalvon pintaan kykenemättä kuitenkaan läpäisemään sitä.²⁸ Syyksi arveltiin, että SV40 iso T -antigeenin sekvenssi muuttuu endosomaalisen kuljetuksen aikana siten, ettei se enää kykene vuorovaikutukseen importin- α -proteiinin kanssa. Ryan *et al.*⁵⁵ saivat vastaavanlaisissa tutkimuksissaan kuitenkin ristiriitaisia tuloksia. Näissä SV40 iso T -antigeenin tumaan ohjaavalla sekvenssillä päällystetyt kultananopartikkelit kulkeutuvat onnistuneesti HeLa-solujen tumaan.

Tutkimusten valossa oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden kyky saavuttaa solun tuma näyttäisi riippuvan käytetystä solulinjasta. Tkachenkon *et al.*⁵² ja Ryannin *et al.*⁵⁵ toisistaan poikkeavat tulokset saattavat osittain selittyä myös käytetyillä analyysimenetelmillä. Tkachenkon tutkimusryhmä selvitti kultananopartikkeleiden lopullista sijaintia optiseen kuvantamiseen perustuvalla VEC-DIC-tekniikalla, jossa solut kiinnitetään ja kuvataan DIC-mikroskoopilla.⁵⁶ Mikroskooppi on varustettu väri-CCD-kameralla, jonka avulla voidaan manuaalisesti kontrolloida yksittäisiä värikanavia ja säädellä kontrastia. Saadut kuvat voidaan esittää värillisinä, koska kultananopartikkelit heijastavat polarisoitua valoa eri aallonpituuksilla kuin ympäröivä biologinen media. Ryann *et al.*⁵⁵ puolestaan erottivat solujen tumat ja käyttivät niiden kultapitoisuuden analysoimiseen ICP-OES-menetelmää. Menetelmässä induktiivisesti kytketty plasma (ICP) tuottaa virittyneitä atomeja ja ioneja, jotka emittoivat sähkömagneettista säteilyä kullekin alkuaineelle ominaisella aallonpituudella.

Solulinjan on osoitettu vaikuttavan myös muilla oligopeptideillä päällystettyjen kultananopartikkeleiden kykyyn saavuttaa solujen solulima ja tuma (taulukko 2).²⁸ Esimerkiksi adenoviruksen kuituproteiinista johdetulla tumaan ohjaavalla oligopeptidillä päällystetyt kultananopartikkelit eivät läpäisseet HepG2-solujen solukalvoa lainkaan, vaikka kulkeutuivat onnistuneesti 3T3/NIH-solujen solulimaan ja läpäisivät kaikki HeLa-solujen kalvorakenteet. Myös HIV-1 Tat -proteiinista johdetulla sekvenssillä päällystetyt kultananopartikkelit on saatu kulkeutumaan ihmisen fibroblastisolujen tumaan,⁵⁷ vaikka ne eivät Tkachenkon *et al.*²⁸ kokeissa saavuttaneet HeLa-, 3T3/NIH- tai HepG2-solujen tumaa.

HIV-1 Tat -peptidistä voidaan valmistaa yhdessä influenssaviruksen hemagglutiniiniproteiinin (HA2) kanssa yhdistelmäpeptidi Tat-HA2, joka kykenee läpäisemään sekä solukalvon että endosomien kalvorakenteet.⁵⁸ HA2 on pH-herkkä proteiini, joka endosomien alhaisessa pH:ssa vaurioittaa niiden kalvorakennetta

vapauttaen endosomien sisällön solulimaan. Kumar *et al.*⁵⁸ kiinnittivät Tat-HA2-oligopeptidejä biotiinin kautta antibioteinivasta-aineisiin, jotka kiinnitettiin edelleen noin 20 nanometriä halkaisijaltaan olevien kultananopartikkeleiden pintaan. Kultananopartikkelit varustettiin myös anti-aktiini vasta-aineilla aktiinifilamenttien kuvantamiseksi. Tutkimuksissa havaittiin, että ilman HA2-proteiinia kultananopartikkelit eivät saavuttaneet NIH/3T3-fibroblastien solulimaa, mutta läpäisivät kuitenkin solukalvon päätyen endosomeihin. Tat-HA2-oligopeptidiä kantavat kultananopartikkelit päätyivät onnistuneesti solulimaan ja niiden avulla voitiin kuvantaa aktiinifilamenttien järjestäytymistä.

Tkachenkon *et al.*²⁸ eri sekvenssejä ja solulinjoja vertailevassa tutkimuksessa kultananopartikkelit päällystettiin myös oligopeptidillä, joka sisälsi integriiniin sitoutuvan domeenin ja kuusi lysiiniä. Kyseisellä sekvenssillä ei ollut entuudestaan tunnettuja tumaan ohjaavia ominaisuuksia, mutta sillä päällystetyt kultananopartikkelit saavuttivat sekä HeLa- että HepG2-solujen tumat. Integriiniin sitoutuva domeeni edistää tunnetusti reseptorivälitteistä endosytoosia, joten tämän osan sekvenssistä uskottiin mahdollistaneen kultananopartikkelien solukalvon läpäisyn. Oligopeptidin kuuden lysiinin ketjun ajateltiin puolestaan mahdollistaneen tumakalvon läpäisyn, sillä vastaavia lysiinirikkaita osia esiintyy myös tunnetuissa tumaan ohjaavissa oligopeptideissä. Positiivisesti varautuneiden lysiinien on myös todettu vaurioittavan negatiivisesti varautuneita vesikkeleiden kalvorakenteita,⁵⁹ joten lysiinit todennäköisesti mahdollistivat kultananopartikkeleiden vapautumisen endosomeista.

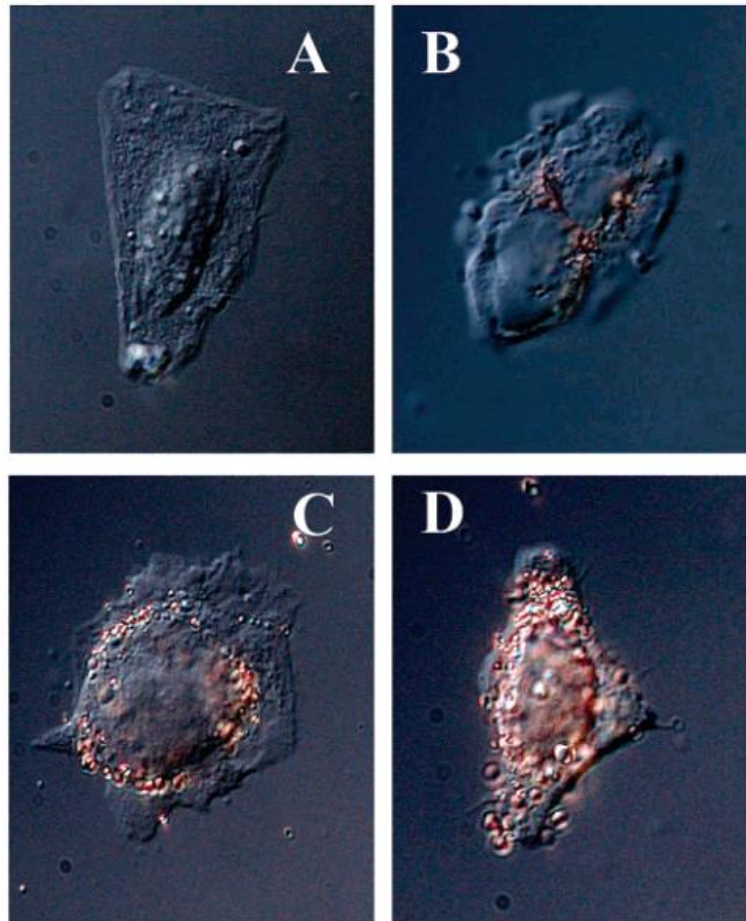
Taulukko 2. Oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden sijainti eri solulinjojen soluissa kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen

Sekvenssi	Alkuperä	HeLa	3T3/NIH	HepG2
CGGGPKKKRKVGG	SV40 iso T	solulima	solulima	solulima
CGGRKKRRQRRRAP	HIV-1 Tat	solulima	ei solussa	solulima
CGGFSTSLRARKA	adenovirus	tuma	solulima	ei solussa
CKKKKGGGRGDMFG	integriiniin sitoutuva domeeni ja oligolysiini	tuma	solulima	tuma

Taulukossa 2 on esitetty yhteenveto eri oligopeptideillä päällystettyjen kultananopartikkeleiden kyvystä saavuttaa solulima ja tuma eri solulinjojen soluilla. Tutkimuksista käy ilmi, että vaikka tietyllä oligopeptidillä päällystetty kultananopartikkeli kykenisi läpäisemään tietyn tyyppisen solun kaikki kalvorakenteet, tulokset eivät ole yleistettävissä muihin solulinjoihin. Tämän vuoksi lääkeaineita kuljettavien kultananopartikkeleiden suunnittelussa saattaa olla tarpeellista harkita useamman eri oligopeptidin käyttöä samanaikaisesti.

Kahden eri soluun ohjaavan sekvenssin yhtäaikainen käyttö osoittautui toimivaksi ratkaisuksi Nativon *et al.*⁶⁰ tutkimuksessa, jossa HI-viruksen Tat-oligopeptidiä ja *Drosophila*-suvun kärpäsillä esiintyvistä antennapedia-proteiinista johdettua Pntn-oligopeptidiä (GRQIKIWFQNRRMKWKK) vertailtiin keskenään. Pelkästään toista sekvenssiä kantavat kultananopartikkelit eivät saavuttaneet HeLa-solujen solulimaa, mutta sekä Tat-oligopeptidin että Pntn-oligopeptidin sisältävät kultananopartikkelit sijoittuivat endosomien ohella osittain myös solulimaan. Kun näihin kultananopartikkeleihin edelleen lisättiin tumaan ohjaava sekvenssi GGFSTSLRARK, kultananopartikkelit sijoittuivat endosomeihin, solulimaan ja tumaan. Lisäksi huomattava osa partikkeleista kasaantui tuman läheisyydessä oleviin epätavallisiin kalvorakenteisiin, joiden arveltiin olevan vaurioituneita endosomeja.

Toisessa tutkimuksessaan Tkachenko *et al.*⁵² valmistivat ja vertasivat kahdella adenoviruksen kuituproteiinista johdetulla oligopeptidillä päällystettyjä kultananopartikkeleita. Adenovirus käyttää toista oligopeptidiä (CKKKKKKSEDEYPYVPN) laukaisemaan endosytoosin. Toinen sekvenssi (CGGFSTSLRARKA) puolestaan ohjaa viruksen tumaan. Tutkittavat peptidit liitettiin BSA-päällysteisiin kultananopartikkeleihin, joita inkuboitiin HepG2-solujen kanssa kaksi tuntia. Tutkimuksessa havaittiin, että pelkällä endosyytosin laukaisevalla peptidillä päällystetyt kultananopartikkelit eivät kulkeutuneet soluun lainkaan (kuva 6A). Pelkällä tumaan ohjaavalla signaalilla päällystetyt kultananopartikkelit pääsivät soluun, mutta jäivät endosomeihin (kuva 6B). Molempia oligopeptidejä kantavat kultananopartikkelit sen sijaan kulkeutuivat tehokkaasti tumaan (kuva 6D).



Kuva 6. Adenoviruksen kuituproteiinilla (C), CKKKKKSEDEYPYPN-sekvessillä (A), CGGFSTSLRARKA-sekvenssillä (B) ja molemmilla sekvensseillä (D) päällystettyjen kultananopartikkeleiden sijoittuminen solussa kahden tunnin HepG2-solujen kanssa inkuboinnin jälkeen. Reprinted with permission from J. Am. Chem. Soc., 2003, 125 (16), pp 4700–4701. Copyright 2003 American Chemical Society.

Tkachenko *et al.*⁵² vertasivat myös molemmilla oligopeptidillä päällystetyjä kultananopartikkeleita adenoviruksen kuituproteiinilla päällystettyihin kultananopartikkeleihin. Vaikka kuituproteiini sisälsi molemmat tutkimuksessa käytetyt sekvenssit, se ohjasi kultananopartikkeleita huonommin tumaan kuin yksittäiset oligopeptidit (kuva 6C). On todennäköistä, että lyhyempien oligopeptidien on avaruudellisesti helpompi lähestyä reseptoreita kuin yhden pidemmän aminohappoketjun.

Tutkimuksissa ei havaittu, että adenoviruksen kuoriproteiineilla tai sen osilla päällystetyillä kultananopartikkeleilla olisi ollut merkittäviä haitallisia vaikutuksia solujen normaalille jakautumiselle.⁵² HepG2-solujen elinkyky heikkeni vain alle 5 % kontrolliryhmään verrattuna inkuboitessa kultananopartikkeleiden kanssa 12 tuntia.

Adenoviruksen kuituproteiinista johdettuja oligopeptidejä on tutkittu myös PEG-päällysteisillä kultananopartikkeilla. Liu *et al.*²⁹ totesivat, että oligopeptidi-PEG-päällysteisten kultananopartikkeiden stabiilisuus kasvoi PEG:n mooliosuuden kasvaessa. Stabiilisuuteen vaikutti myös se, oliko soluun ohjaavat signaalit liitetty PEG-päällysteisiin kultananopartikkeliin erikseen vai lisätty reaktioseokseen samassa vaiheessa PEG-molekyylin kanssa. Ligandien yhtäaikainen lisääminen heikensi kultananopartikkeiden stabiilisuutta merkittävästi.

Koska PEG toisaalta stabiloii kultananopartikkeliä ja toisaalta heikentää sen vuorovaikutusta solujen kanssa, sopivan suhteen löytäminen kohteeseen ohjaavan oligopeptidin ja PEG:n välille voi olla haasteellista. Lisäksi oligopeptidien määrä kultananopartikkelin pinnalla saattaa vaikuttaa partikkelin toksisuuteen. Ryan *et al.*⁵⁵ havaitsivat, että suurempi osa kultananopartikkeista päätyi soluun, kun kultananopartikkeiden koko kasvoi tai kun tumaan ohjaavan oligopeptidin määrää niiden pinnalla kasvatettiin. Ligandien määrän lisääminen kasvatti kuitenkin myös kultananopartikkeiden toksisuutta. Sopiva tasapaino tumaan kulkeutumisen ja toksisuuden välillä saavutettiin noin 30 oligopeptidillä päällystetyillä halkaisijaltaan viiden nanometrin kultananopartikkeilla.

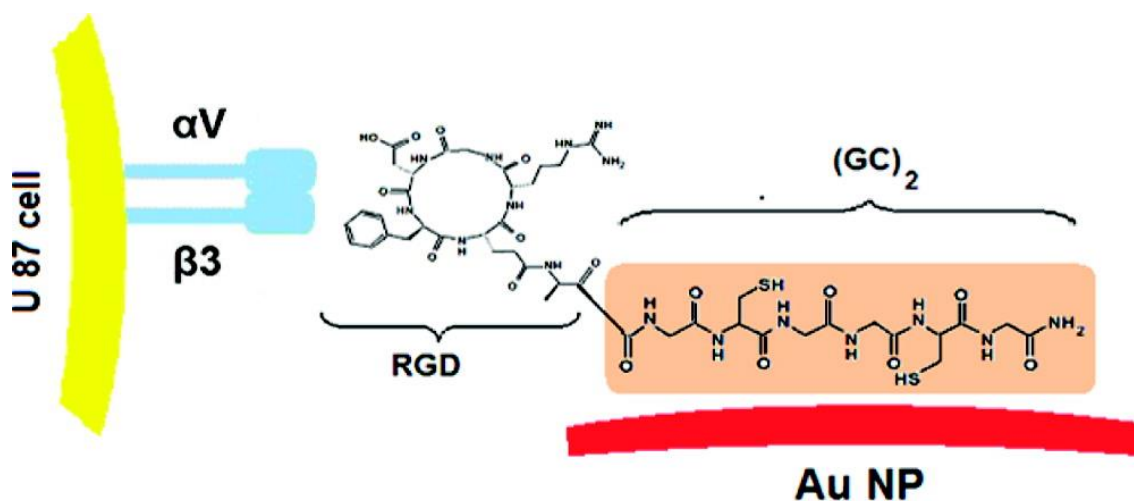
2.2.1 Soluun ja tumaan ohjautuvat kultananopartikkelit syövän hoidossa

Nykypäivänä syöpähoidon suurimpana ongelmana on vaikeus kohdentaa hoito spesifisesti syöpäsoluihin. Terveille soluille aiheutuvia sivuvaikutuksien minimoimiseksi annostuksia joudutaan rajoittamaan. Oligopeptidien kyky tunnistaa solun rakenteita spesifisesti saattaa tulevaisuudessa tarjota ratkaisun lääkeaineiden kohdennettuun kuljetukseen liittyviin ongelmiin, sillä syöpäsolujen kohdalla tiettyjen reseptorien määrä solukalvolla on usein monikertaistunut terveisiin soluihin verrattuna.^{27c} Liitämällä tällaisiin reseptoreihin spesifisesti sitoutuvia oligopeptidejä kultananopartikkeiden pintaan partikkelit saadaan kulkeutumaan valikoivasti syöpäsoluihin.

Yksi tiettytyyppisten syöpäsolujen pinnalla runsaana esiintyvä reseptorityyppi on Neuropilin-1 (Nrp-1) -reseptori.⁶¹ Kumar *et al.*¹⁴ käyttivät tähän reseptoriin sitoutuvaa CRGDK-oligopeptidiä valmistamiensa kultananopartikkeiden kuorikerroksen

komponenttina ja havaitsivat *in vitro*, että kyseisellä oligopetidillä varustetut kultananopartikkelit pääsivät tehokkaammin syöpäsolujen sisään kuin tioproniinilla (kuva 3) päällystetyt kultananopartikkelit. Verrattaessa CRGDK-päällysteisten kultananopartikkeleiden toksisia vaikutuksia kahteen eri syöpäsolulinjaan havaittiin, että vaikutus oli suurempi siinä solulinjassa, jonka solujen pinnalla esiintyi enemmän Nrp-1-reseptoreita. Tämä osoitti, että CRGDK-oligopeptidi ohjaa kultananopartikkeleita selektiivisesti runsaasti Nrp-1-reseptoreita kantaviin soluihin.

Toisessa tutkimuksessa Scari *et al.*⁶² päällystivät kultananopartikkeleita yhdistelmäoligopeptidillä RGD-(GC)₂ (kuva 7). RGD-sekvenssi on johdettu syklistä RGDfK-peptidistä, joka toimii integriini $\alpha_v\beta_3$ -reseptorin antagonistina. Kyseistä reseptoria esiintyy erityisesti aktiivisten endoteelisolujen ja syöpäsolujen solukalvoilla.⁶² Tästä syystä syklinen RGD-sekvenssin sisältävä osa valittiin ohjaamaan kultananopartikkelit syöpäsoluihin. RGDfK-sekvenssin viimeinen lysiini vaihdettiin glutamiinihappoon, jonka γ -karboksyyliiryhmän kautta sekvenssi liitettiin (GC)₂-osaan. Toistuvan GC-sekvenssin sisältävän osan tarkoituksena oli puolestaan kiinnittää syklinen RGD-osa kultananopartikkeleiden pintaan ja samalla stabiloida partikkeleita. Kokeet suoritettiin U 87 -glioblastoomasoluilla, joiden solukalvolla $\alpha_v\beta_3$ -reseptorin ilmeneminen on runsastunutta. Havaittiin, että ilman RGD-oligopeptidiä GC-stabiloitujen kultananopartikkeleiden kulkeutuminen soluihin oli vähäisempää kuin RGD-sekvenssiä kantavien kultananopartikkeleiden. Lisäksi kultananopartikkeleita löydettiin solujen tumasta, mikä viittaa siihen, että RGD toimisi myös tumakalvon läpäisevänä oligopeptidinä.



Kuva 7. Syklisen RGD-sekvenssin ja siihen (GC)₂ -osan kautta linkitetyn kultananopartikkelin sitoutuminen U 87 -solun pinnalla esiintyvään $\alpha_V\beta_3$ -reseptoriin.

Reprinted with permission from Bioconjugate Chem., 2012, 23 (3), pp 340–349.

Copyright 2012 American Chemical Society.

Myös Kang *et al.*⁶³ hyödynsivät samaa RGD-sekvenssiä kultananopartikkeleiden ohjauksessa syöpäsoluihin. Kultananopartikkelit stabiloitiin aluksi PEG:llä ja funktionalisoitiin syöpäsoluihin ohjaavalla sekvenssillä sekä tumaan ohjaavalla KKKRK-sekvenssillä. Syöpäsolujen malliksi valittiin ihmisen oraalinen okasolukarsinooma (HSC) ja terveiden solujen malliksi ihmisen keratinosyytit (HaCat). Tutkimuksissa havaittiin oletusten mukaisesti, että RGD-oligopeptidi yksinään ohjasi kultananopartikkeleita syöpäsolujen solulimaan, mutta sekä RGD- että KKKR-oligopeptidin sisältävät kultananopartikkelit ohjautuivat syöpäsolujen tumaan.

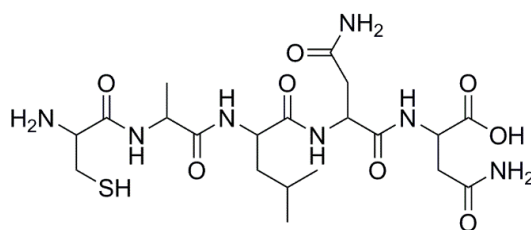
Injektoitujen elävien solujen seurannassa havaittiin myös, että kummallakin oligopeptidillä päällystettyjen kultananopartikkeleiden konsentraation ollessa 0.1 nM normaali solunjakautumisprosessi hidastui ja estyi lopulta kokonaan konsentraation ollessa 0.4 nM.⁶³ Sen sijaan, että solulima olisi jakautunut solunjakautumisen loppuvaiheessa kahtia, aktiinin ja myosiinin muodostama supistava rengasrakenne rentoutui ja tytärsolut yhdistyivät muodostaen kaksitumaisen solun. 0.4 nM kultananopartikkelikonsentraation todettiin myös aiheuttavan vaurioita syöpäsolujen DNA:han. Vastaavaa sytokineesin estymistä ei havaittu tavallisilla soluilla lainkaan. Tavallisista soluilla ei myöskään havaittu apoptoosia siinä, missä kultananopartikkeleiden kanssa inkuboiduista syöpäsoluista noin 20 % oli apoptoottisia

24 tunnin jälkeen. Tulokset osoittivat, että RGD- ja KKKR-oligopeptidit ohjaavat kultananopartikkeleita spesifisesti syöpäsolujen tumaan ja estävät näiden solujen normaalin jakaantumisen edesauttaen syöpäsolujen apoptoosia, mutta eivät vaaranna terveitä soluja.

2.3 Synteettiset oligopeptidit kultananopartikkeleiden päällystyksessä

Kultananopartikkeleiden päällystyksessä voidaan käyttää myös täysin synteettisiä oligopeptidejä. Käytettävä aminohapposekvenssi valitaan oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden tulevan käyttötarkoituksen mukaan, mutta valinnassa on otettava huomioon myös muutamia yleisiä seikkoja. Eräs näistä on vesiliukoisuuden säilyttäminen. Oligopeptidin tulee sisältää sopivissa määrin nanopartikkelin pinnasta ulospäin suuntautuvia hydrofiilisiä ryhmiä, jotta fysiologisissa olosuhteissa välttyään aggregaattien muodostumiselta. Samalla oligopeptidin keskiosan tulisi sisältää joko hydrofobisia tai polaarisia sivuketjuja, jotta ligandien itsejärjestäytyminen tiiviiksi kuoreksi hydrofobisten vuorovaikutusten tai vetysidosten kautta olisi mahdollista.³³

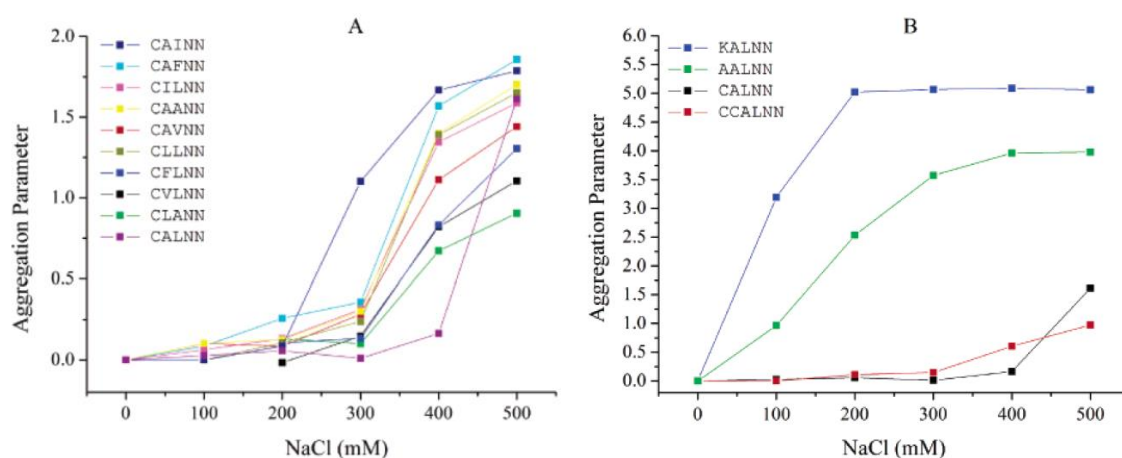
Koska aminohapot voivat sisältää sekä positiivisesti että negatiivisesti varautuneita funktionaalisia ryhmiä, on myös pyrittävä välttämään sähköisistä vuorovaikutuksista aiheutuvaa kasaantumista.³³ Tämä tapahtuu yleensä varmistamalla, että oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit ovat ulospäin joko täysin positiivisesti tai täysin negatiivisesti varautuneita. Vesiliukoisuuden ohella on yleensä myös toivottavaa, että valittu oligopeptidi on helppo kiinnittää kultananopartikkelin pintaan ja sisältää tätä tarkoitusta varten esimerkiksi kysteiniiniä.



3

Kuva 8. CALNN-pentapeptidin rakenne

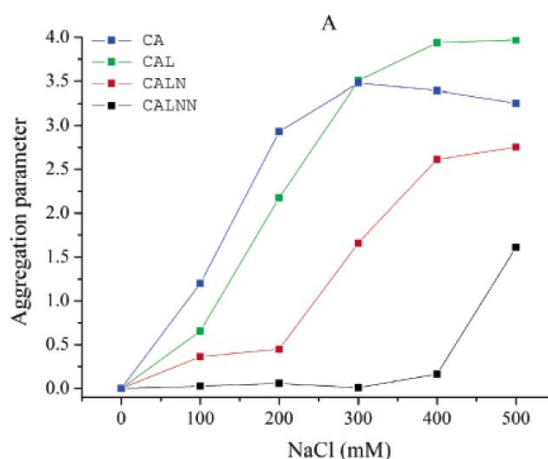
Lévy *et al.*³³ suunnittelivat edellä kuvattujen periaatteiden pohjalta kysteiinin, alaniinin, leusiinin ja kahden asparagiinin muodostaman pentapeptidin (CALNN, kuva 8), joka voitiin liittää kultananopartikkeleiden pintaan terminaalisen kysteiinin tioliryhmän kautta. Kysteiniä seuraaviksi aminohapoiksi valittiin alaniini ja leusiini näiden hydrofobisten sivuketjujen vuoksi edesauttamaan oligopeptidien itsejärjestäytymistä kultananopartikkeliä suojaavaksi ligandikuoreksi. Nanopartikkeleiden pinnan kaarevuus pyrittiin huomioimaan asettamalla pidemmän hydrofobisen sivuketjun omaava leusiini kauemmas ytimestä. Ulommaiseksi aminohapoksi valittiin hydrofiilisen aminoryhmän sisältävä asparagiini varmistamaan kultananopartikkeleiden vesiliukoisuus. Kun CALNN-päällysteisiä kultananopartikkeleita verrattiin systemaattisesti muilla pentapeptideillä päällystettyihin kultananopartikkeleihin erivahvuissa NaCl-liuoksissa, ne todettiin erittäin stabiileiksi (kuva 9).



Kuva 9. Aggregoituminen NaCl-konsentraation funktiona eri oligopeptideillä päällystetyille kultananopartikkeleille. Reprinted with permission from J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 (32), pp 10076–10084. Copyright 2004 American Chemical Society.

Samassa tutkimuksessa havaittiin, että aggregaatiota aiheuttavat erityisesti sellaiset aminohapposekvenssit, joissa funktionaaliset ryhmät voivat reagoida keskenään ja liittää kaksi kultananopartikkeliä toisiinsa.³³ Oligopeptidin sekvenssin ohella myös peptidiketjun pituus vaikuttaa kultananopartikkeleiden stabiilisuuteen (kuva 10). Mitä

lyhyempi ketju on, sitä alhaisempi NaCl-konsentraatio riittää laukaisemaan kultananopartikkeleiden aggregaation. Tämän arvellaan johtuvan siitä, että pidempien ketjujen välillä voi muodostua enemmän tiivistä pakkautumista edistäviä vuorovaikutuksia.



Kuva 10. Oligopeptidin aminohappoketjun pituuden vaikutus oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden stabiilisuuteen. Reprinted with permission from J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 (32), pp 10076–10084. Copyright 2004 American Chemical Society.

CALNN-päällysteisten kultananopartikkeleiden stabiilisuus mahdollistaa niiden kylmäkuivauksen ja säilyttämisen jauhemaisessa muodossa. Säilytyksen jälkeen ne voidaan liuottaa uudelleen ja tuloksena on stabiili dispersio.³³ Lisäksi CALNN-stabiloidut kultananopartikkelit kestävät suodatusta, elektroforeesia ja sentrifugointia sekä useita erilaisia kromatografisia menetelmiä, kuten ioninvaihtokromatografiaa ja yleisiä proteiinien puhdistamisessa käytettäviä nestekromatografiamenetelmiä.³¹

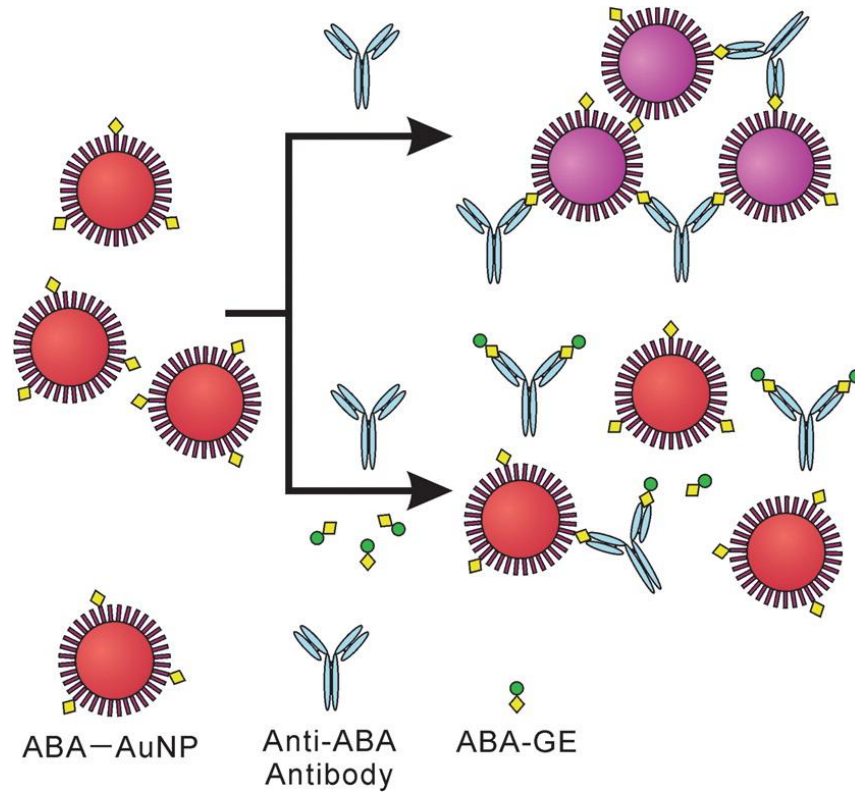
2.3.1 CALNN-oligopeptidillä ja sen johdannaisilla päällystettyjen kultananopartikkeleiden kolorimetriset sovellukset

Biologisten sovellusten kannalta CALNN-oligopeptidin ongelmana on, että se ei adsorboidu solukalvon pintaan.⁶⁴ CALNN-oligopeptidiä voidaan kuitenkin käyttää yhdessä sen johdannaisen CALNNR₈:n kanssa ohjaamaan kultananopartikkeleita

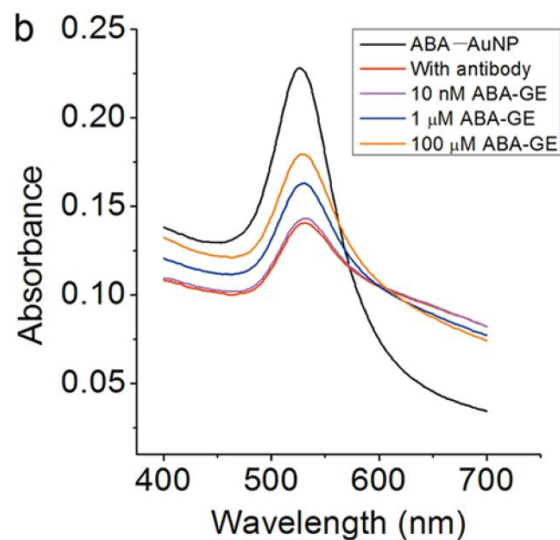
solunsisäisiin kohteisiin, sillä arginiinirikkaat peptidit läpäisevät solukalvon erittäin tehokkaasti.⁶⁵ Solut myös käyttävät arginiiniin perustuvia signaalisekvenssejä solun sisäisessä liikenteessä ohjaamaan molekyyliä solulimakalvostoon.⁶⁶ Sun *et al.*⁶⁴ osoittivat, että CALNN ja CALNNR₈-päällysteisten kultananopartikkeleiden solukalvonläpäisy tapahtuu spontaanisti, ja että kultananopartikkeleiden sijoittuminen solussa riippuu eri oligopeptidien suhteellisista määristä. 0.138 mM (10 % ligandien kokonaismäärästä) CALNNR₈-konsentraatiolla kultananopartikkelit päätyivät tumaan. Pelkällä CALNNR₈-oligopeptidillä päällystetyt kultananopartikkelit puolestaan eivät saavuttaneet tumaa vaan jäivät oletetusti solulimakalvostoon.

CALNN-oligopeptidiä on myös hyödynnetty kolorimetrisiin sovelluksiin tarkoitettujen kultananopartikkeleiden stabiloimisessa. Esimerkiksi Zhou *et al.*⁶⁷ kehittivät vasta-aineiden laukaisemaan kultananopartikkeleiden aggregaatioon perustuvan kolorimetrisen kokeen abskissihapon glukosiesterin (ABA-GE) määrittämiseksi. Abskissihappo (ABA) on kasvihormoni, joka säätelee muun muassa kasvien kasvua ja reaktioita abioottiseen stressiin.⁶⁸ ABA-GE on puolestaan muoto, jossa ABA:n kuljetus kasveissa tapahtuu.⁶⁹ ABA-GE-pitoisuuden määrittäminen on hyödyllistä kasvien metabolian, kehityksen ja ympäristön välisiä suhteita tutkittaessa.

Kultananopartikkeleiden käyttö kolorimetrisissä analyyseissä perustuu siihen, että kultananopartikkeleiden optiset ominaisuudet riippuvat liuoksessa olevien partikkeleiden keskinäisistä välimatkoista.⁷⁰ Zhou *et al.*⁶⁷ kolorimetrisessä kokeessa valmistettiin CALNN-oligopeptidillä ja sen ABA-molekyylin sisältävällä johdannaisella CALNNGK_(ABA)G päällystettyjä kultananopartikkeleita. ABA:oon sitoutuvan vasta-aineen läsnä ollessa nämä kultananopartikkelit muodostivat aggregaatteja ja liuoksen havaittiin muuttuvan punaisesta violetiksi. Jos vasta-aineiden ohella läsnä oli myös ABA-GE-molekyyliä, ne kilpailivat vasta-aineiden sitoutumispaikoista kultananopartikkeleiden kanssa ja estivät aggregaattien muodostumisen (kuva 11). Tällöin liuoksen värinmuutos jäi heikommaksi ABA-GE:n konsentraatiosta riippuen (kuva 12). Kyseinen menetelmä mahdollistaa ABA-GE:n läsnäolon havaitsemisen välittömästi paljaalla silmällä ja kvantitatiivisten määritysten tekemisen esimerkiksi UV-VIS-spektroskopiolla.



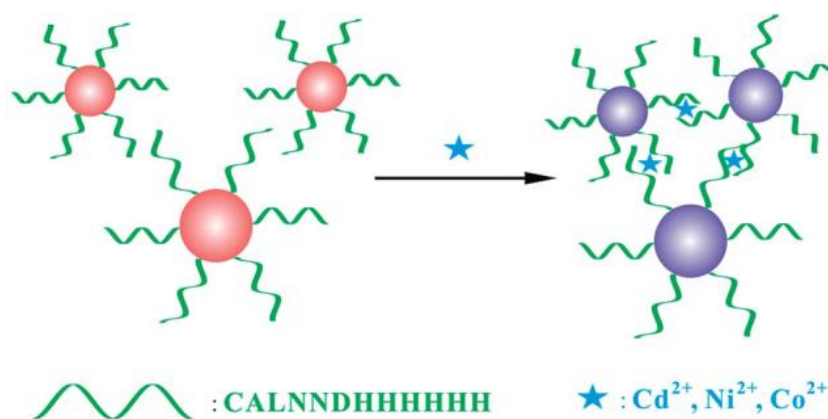
Kuva 11. CALNN- ja CALNNGK(ABA)G-päällysteisten kultananopartikkeleiden aggregoituminen ja sitä seuraava värinmuutos ABA:oon sitoutuvien vasta-aineiden läsnäollessa sekä aggregoitumisen estyminen ABA-GE:n läsnäollessa. Reprinted with permission from ACS Appl. Mater. Interfaces, 2012, 4 (9), pp 5010–5015. Copyright 2012 American Chemical Society.



Kuva 12. Kultananopartikkeleiden absorbanssi eri ABA-GE-konsentraatioissa. Reprinted with permission from ACS Appl. Mater. Interfaces, 2012, 4 (9), pp 5010–5015. Copyright 2012 American Chemical Society.

Toisessa tutkimuksessa Zhang *et al.*⁷¹ kehittivät CALNN:sta johdettuun CALNNDHHHHH-oligopeptidiin perustuvan kolorimetrinen kokeen veden raskasmetallipitoisuuden selvittämiseksi. Idean taustalla oli tieto siitä, että useat metalli-ionit vuorovaikuttavat aminohappojen ja peptidien kanssa.⁷² Esimerkiksi polyhistidiinin on todettu muodostavan komplekseja nikkeli-, kadmium- ja koboltti-ionien kanssa. Tämä tapahtuu lähekkäisten histidiinien sivuketjujen imidatsolirenkaiden typpiatomien muodostaessa koordinaatiosidoksia metalli-ionien kanssa.⁷³ Näin ollen Zhangin *et al.*⁷¹ kokeessa polyhistidiinin sisältävä CALNN-oligopeptidi toimi sekä kultananopartikkeleita stabiloivana että metalli-ioneja kompleksoivana ligandina.

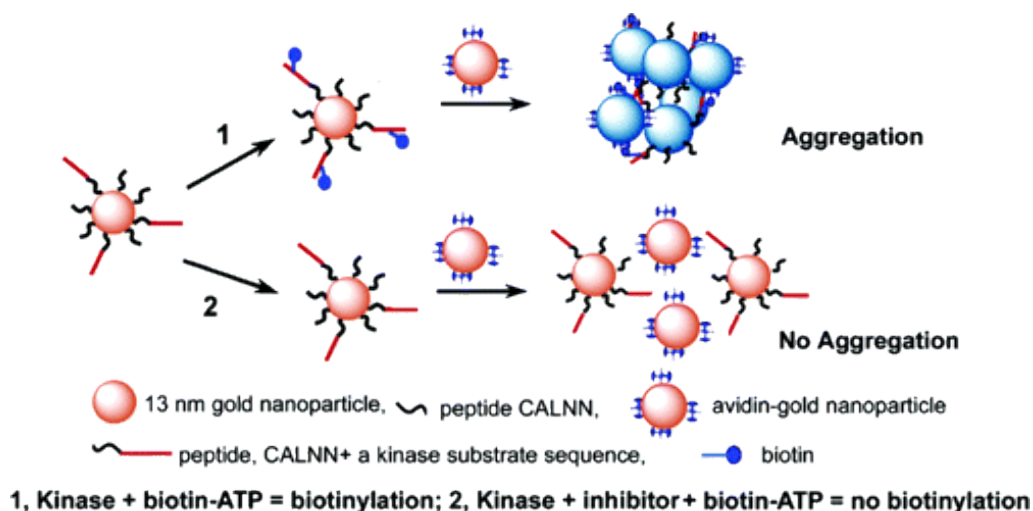
Kun CALNNDHHHHH-päällysteisiä kultananopartikkeleita sisältävään liuokseen lisättiin Cd^{2+} -, Ni^{2+} - tai Co^{2+} -ioneja, niiden vuorovaikutukset oligopeptidien kanssa johtivat kultananopartikkeleiden aggregaatioon, joka havaittiin liuoksen värinmuutoksena (kuva 13).⁷¹ Aggregoitumista ei tapahtunut mono- tai trivalenteilla ioneilla eikä joukolla muita divalenttisia ioneja (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+}), mikä osoitti menetelmän spesifisyyden Cd^{2+} :n, Ni^{2+} :n ja Co^{2+} :n suhteen. Pienimmät havaittavissa olevat pitoisuudet näille ioneille olivat 0.05 μM , 0.3 μM ja 2 μM .



Kuva 13. Metallionien ja polyhistidiinin välisten vuorovaikutusten aiheuttama kultananopartikkeleiden aggregaatio ja sitä seuraava liuoksen värin muutos. Reproduced from Analyst, 2012, 137, 601-607 with permission of The Royal Society of Chemistry.

CALNN-päällysteisiä kultananopartikkeleita on käytetty pohjana myös kolorimetrisessä kokeessa, joilla voidaan testata proteiinikinaasien inhibiittoreiden toimivuutta.⁷⁴ Proteiinikinaasit ovat solukalvon reseptoreita, jotka toimivat samanaikaisesti soluliman puolella myös entsyymeinä.^{27d} Kun solun ulkopuolinen substraatti sitoutuu proteiinikinaasiin, kinaasi aktivoituu ja katalysoi soluliman puolella tapahtuvaa kemiallista reaktiota. Usein tämä reaktio on fosforylaatio, jossa kinaasi liittyy fosfaattiryhmän proteiiniin. Fosforylaation seurauksena kyseinen proteiini aktivoituu ja välittää signaalin seuraavalle molekyylille solunsisäisessä viestiketjussa. Koska kinaaseilla on keskeinen rooli solun ja sen ympäristön välisessä kommunikaatiossa, ne ovat erinomaisia kohteita lääkeaineille, erityisesti kinaasin toiminnan estäville inhibiittoreille.

Wang *et al.*⁷⁴ kehittivät kolorimetrinen kokeen, jolla voidaan nopeasti selvittää potentiaalisten proteiinikinaasi-inhibiittoreiden toimivuutta. Kokeessa hyödynnettiin CALNN-päällysteisiä kultananopartikkeleita, joissa 10 %:iin peptidiligandeista oli liitetty tietyn kinaasin spesifisenä substraattina toimiva sekvenssi. Toisin sanoen kinaasien luonnollinen substraatti korvattiin funktionalisoiduilla kultananopartikkeleilla. Kun kyseisiä kultananopartikkeleita inkuboitiin proteiinikinaasien kanssa γ -biotini-ATP-kosubstraatin läsnäollessa, kinaasien katalysoiman reaktion lopputuotteena muodostui biotinyloitujia kultananopartikkeleita (kuva 14, skenaario 1). Kun joukkoon lisättiin edelleen avidiini-päällysteisiä kultananopartikkeleita, nämä muodostivat aggregaatteja biotinyloitujen kultananopartikkelien kanssa. Avidiini on glykoproteiini, jonka kyky sitoa biotiinia on hyvin tunnettu.⁷⁵ Aggregaatio oli havaittavissa paljaalla silmällä liuoksen värin muutoksena punaisesta siniseksi. Useiden tuntien kuluttua aggregaatio johti lopulta myös saostumiseen. Vastaavaa värinmuutosta tai saostumaa ei havaittu, kun kultananopartikkeleiden ja kinaasien joukkoon lisättiin tunnettuja kinaasi-inhibiittoreita (kuva 14, skenaario 2).



Kuva 14. Kaavakuva kinaasin suorittamasta oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden biotinylaatiosta ja sitä seuraavasta avidiini-päällysteisten kultananopartikkeleiden lisäyksen aiheuttamasta aggregaatiosta ilman inhibiittoria (skenaario 1) ja sen läsnäollessa (skenaario 2). Reprinted with permission from J. Am. Chem. Soc., 2006, 128 (7), pp 2214–2215. Copyright 2006 American Chemical Society.

Wang *et al.*⁷⁴ havaitsivat myös, että inhibiittorin konsentraation ollessa alhainen kultananopartikkeleiden UV-VIS-spektrin punasiirtymä riippui inhibiittorin konsentraatiosta. Näin ollen kyseistä menetelmää voidaan potentiaalisten inhibiittorien toimivuuden testaamisen ohella käyttää apuna myös eri inhibiittoreiden IC₅₀-arvojen arvioimisessa. IC₅₀ on inhibiittorin pitoisuus, joka riittää estämään puolet reaktioista ja kertoo siten inhibiittorin tehokkuudesta.

2.4 Terapeuttiset oligopeptidit

Oligopeptidi voi toimia paitsi kultananopartikkeliä stabiloivana tai tiettyyn kohteeseen ohjaavana ligandina myös itse hoitavana komponenttina. Kumar *et al.*¹⁴ valmistivat pieniä halkaisijaltaan noin kaksi nanometriä olevia oligopeptidipäällysteisiä kultananopartikkeleita, joissa Neuropilin-1-reseptoreihin sitoutuvaa CRGDK-sekvenssiä käytettiin ohjaamaan kultananopartikkeleita syöpäsoluihin. Toinen samoihin kultananopartikkeleihin liitetty sekvenssi TSFAEYWLLSP toimi terapeuttisessa tarkoituksessa MDM2- ja MDMX-komplekseihin sitoutuvana inhibiittorina. MDM2 ja

MDMX säätelevät proteiinin p53 toimintaa, joka puolestaan säätelee tiettyjen geenien luentaa ja voi epäsuorasti aiheuttaa solusyklin pysähtymisen, DNA:n vaurioitumisen tai apoptoosin.⁷⁶ MDM2:n ja MDMX:n toiminnan inhiboimisella on siten monimutkaisen biologisen säätelyketjun kautta syöpäkasvaimen kasvua hidastava vaikutus.

Kultananopartikkeleita on käytetty myös kuljettamaan terapeuttisia KPQPRPLS- ja KATWLPPR-oligopeptidejä, joiden avulla voidaan säädellä angiogeneesiä.^{77,78} Angiogeneesi on prosessi, jossa aktivoituneet endoteelisolut jakaantuvat muodostaen uusia verisuonia.⁷⁹ Uusien verisuonten muodostuminen on tärkeää useissa kehon toimintaan liittyvissä muutoksissa kuten kudosten kasvussa, haavojen parantumisessa ja raskauden aikana. Angiogeneesi liittyy olennaisesti myös syöpään, sillä kasvava syöpäkasvain ruokkii kasvuaan ja kasvaimen sisempiä soluja stimuloimalla uusien verisuonten kasvua. Lisäksi uudet verisuonet mahdollistavat syöpäsolujen pääsyn verenkiertoon ja aiheuttavat siten etäpesäkkeiden muodostumisen.

Endoteelisolujen pinnalla esiintyy kahdenlaisia reseptoreita, joiden aktivaatio johtaa solunsisäisen signaalivälitysketjun kautta angiogeneettisten geenien aktivoitumiseen. Toinen näistä reseptoreista on verisuonen endoteelin kasvutekijän reseptori (VEGFR-1) ja toinen Neuropilin-1 (Nrp-1) -reseptori.⁸⁰ KPQPRPLS-oligopeptidin toiminta perustuu sen kykyyn laukaista solunsisäinen signaalisarja sitoutumalla VEGFR-1-reseptoriin RPL-sekvenssin kautta.⁸¹ KATWLPPR-oligopeptidi toimii puolestaan inhibiittorina, joka sitoutuu Nrp-1-reseptoriin estäen luonnollista substraattia aktivoimasta solunsisäistä viestiketjua.⁸²

Bartczak *et al.*⁷⁸ tutkivat kyseisillä sekvensseillä päällystettyjen kultananopartikkeleiden vaikutusta ihmisen napanuoran verisuonten endoteelisolujen angiogeneettisten geenien ilmentymiseen *in vitro*. KPQPRPLS-päällysteiset kultananopartikkelit lisäsivät oletetusti seurattavien geenien ilmentymistä, kun taas KATWLPPR-päällysteiset kultananopartikkelit vähensivät sitä. Tutkimuksissa havaittiin myös, että oligopeptidipäällysteiset kultananopartikkelit toimivat vapaita oligopeptidejä tehokkaammin. Tämä saattaa selittyä sillä, että kultananopartikkeleiden pinnalla oligopeptidien paikallinen konsentraatio on suuri. Vaihtoehtoisesti on mahdollista, että kultananopartikkeleiden pinnalla oligopeptidit asettuvat helpommin oikeanlaiseen konformaatioon, joka mahdollistaa sitoutumisen reseptoriin.

Myöhemmissä tutkimuksissa Bartczak *et al.*⁷⁷ osoittivat, että KPQPRPLS- ja KATWLPPR-päällysteisiä kultananopartikkeleita voidaan käyttää angiogeneesin

säätelyyn *in vitro*. Uusien kapillaarien muodostumista seuraavassa tutkimuksessa KPQPRPLS-päällysteisten kultananopartikkeleiden kanssa inkuboiduissa endoteelisoluissa havaittiin merkkejä angiogeenisistä jo kahden tunnin inkuboinnin jälkeen, kun ilman kultananopartikkeleita inkuboiduilla soluilla vastaava aika oli kahdeksan tuntia. KATWLPPR-päällysteisten kultananopartikkeleiden kanssa kahdeksan tuntia inkuboidut endoteelisolut eivät kasvattaneet uusia kapillaareja lainkaan. Lisäksi havaittiin, että KATWLPPR-päällysteisten kultananopartikkeleiden kanssa inkuboitujen MCF-7- ja MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen kyky aiheuttaa angiogeenisiä heikkeni eivätkä syöpäsolut kyenneet tuottamaan yhtä paljon angiogeenisiä edistäviä kasvutekijöitä kuin aiemmin.

2.5 Muita sovelluksia

Spesifisesti kohteeseensa kuljetettujen kultananopartikkeleiden säteilytystä voidaan käyttää syövän lisäksi myös muiden kehonsisäisten kohteiden, kuten myrkyllisten tai tukkeumia aiheuttavien aggregaattien, tuhoamiseen. Kogan *et al.*⁸³ hyödynsivät menetelmää virheellisesti laskostuneiden proteiinien muodostamien aggregaattien, amyloidien, hajotukseen. Muutokset proteiinien konformaatioissa saattavat johtaa tilanteeseen, jossa ulospäin suuntautuvien hydrofobisten osien määrä lisääntyy. Tällöin proteiinien liukoisuus heikkenee ja ne alkavat aggregoitua muodostaen liukenemattomia amyloidifibrillejä.⁸⁴ Fibrillien muodostuminen on yhteydessä amyloidoosi-sairauksiin, joita ovat muun muassa Alzheimerin, Parkinsonin ja Huntingtonin taudit.

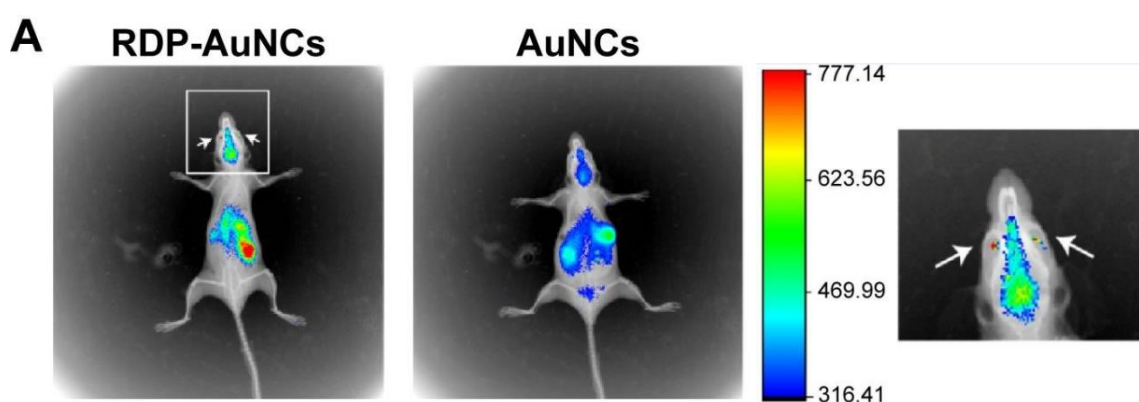
Kogan *et al.*⁸³ valitsivat kohteekseen $A\beta_{1-42}$ -proteiinin aggregaatit, joiden muodostuminen on tyypillistä Alzheimerin taudissa. Kultananopartikkelit ohjattiin sitoutumaan $A\beta$ -aggregaatteihin CLPFFD-oligopeptidin avulla. LPFFD-sekvenssin on aiemmin osoitettu sitoutuvan selektiivisesti $A\beta$ -aggregaatteihin ja riittävän korkeissa konsentraatioissa estävän amyloidifibrillien kasvua.⁸⁵ Virheellisesti laskostuneiden proteiinien itsejärjestymisen aggregaateiksi on tasapainoreaktio, jossa sakkautuvien aggregaattien muodostuminen suosii uusien aggregaattien muodostumista. Jotta reaktion tasapaino saataisiin siirrettyä liukoisten monomeerien muodostumista suosivaksi, tulisi LPFFD-oligopeptidin konsentraation olla hyvin korkea. Kogan *et al.*⁸³ käyttämä oligopeptidin ja $A\beta$ -proteiinin suhde (1:10) ei ollut riittävän korkea estämään aggregaatiota.

Tutkimuksessa CLPFFD-päällysteisiä kultananopartikkeleita inkuboitiin $A\beta_{1-42}$ -proteiinien kanssa seitsemän päivää.⁸³ Ennen aggregaattien muodostumista liuos oli väriltään punertava viitaten tasaisesti levittäytyneisiin kultananopartikkeleihin. Inkuboinnin aikana $A\beta$ -proteiinit alkoivat spontaanisti muodostaa fibrillejä, jotka lopulta saostuivat ja erottuivat mustana sakkana kirkkaaksi muuttuneen liuoksen pohjalla. Kun liuosta säteilytettiin matalaenergisillä mikroaalloilla (0.1 W), aggregaatteihin kiinnittyneet kultananopartikkelit absorboivat säteilyä ja saivat aikaan aggregaattien hajoamisen, joka havaittiin liuoksen punaisen värin palaamisena. Kontrollikokeissa, jotka suoritettiin ilman kultananopartikkeleita, säteilytys sen sijaan nopeutti aggregaattien muodostumista, mikä johtui todennäköisesti mikroaaltojen lisäämästä molekyylien välisten törmäysten määrästä. Lopuksi säteilytettyä kultananopartikkeleiden ja $A\beta_{1-42}$ -proteiinien liuosta seurattiin toiset seitsemän päivää, mutta uusia aggregaatteja ei enää muodostunut. Näin ollen kultananopartikkeleiden säteilyttämisen pääteltiin merkittävästi heikentäneen $A\beta_{1-42}$ -proteiinien taipumusta muodostaa amyloidifibrillejä *in vitro*.

Luvussa 2.2 on käsitelty soluun ja tumaan ohjaavia oligopeptidejä, joilla päällystettyjä kultananopartikkeleita on suunniteltu hyödynnettävän erityisesti syövän hoidossa ja kuvantamisessa. Soluihin ohjaavien oligopeptidien laajentuneesta valikoimasta huolimatta aivoissa sijaitsevien hermosolujen spesifinen kuvantaminen on säilynyt hyvin haasteellisena. Vaikka halkaisijaltaan noin kymmenen nanometriä olevien kultananopartikkeleiden on todettu läpäisevän aivoja suojaavan veri-aivoesteen, ilman kudosspesifisyyttä vain pieni määrä injektoiduista partikkeleista päätyy aivoihin.⁸⁶

Zhang ja Fu⁸⁷ käyttivät pitkää 39:sta aminohaposta koostuvaa rabies-viruksen glykoproteiinista johdettua peptidiä (RDP) ohjaamaan kultananopartikkelit hermosoluihin. Fu *et al.*⁸⁸ osoittivat aiemmassa tutkimuksessaan, että RDP:tä voidaan käyttää kuljettamaan yksittäisiä proteiineja hiirien keskushermostoon *in vivo*. Myöhemmässä tutkimuksessa Zhang ja Fu⁸⁷ vertasivat RDP-päällysteisiä kultananopartikkeleita BSA-päällysteisiin kultananopartikkeleihin. *In vitro* kokeissa havaittiin, että RDP-päällysteiset kultananopartikkelit läpäisevät ihmisen neuroblastoomasolujen (SH-SY5Y) solukalvon BSA-päällysteisiä kultananopartikkeleita paremmin ja kulkeutuivat näihin soluihin paremmin kuin ihmisen keuhkoista eristetyn A549-solulinjan soluihin osoittaen siten spesifisyyttä hermosoluja kohtaan.

Hiirillä suoritetuissa *in vivo* tutkimuksissa havaittiin, että tunnin kuluttua injektiosta merkittävä osa RDP-päällysteisistä kultananopartikkeleista oli kulkeutunut aivoihin.⁸⁷ Myös BSA-päällysteisillä kultananopartikkeleilla injektoitujen hiirien aivoissa nähtiin fluoresenssi-signaali, mutta se oli RDP-päällysteisten kultananopartikkeleiden antamaa signaalia heikempi (kuva 15). Erityisen vahva fluoresenssisignaali havaittiin RDP-päällysteisillä kultananopartikkeleilla injektoitujen hiirten silmissä, mikä viittaa siihen, että kyseiset kultananopartikkelit kykenivät ylittämään veri-retinaaliesteen (kuva 15, nuolet).

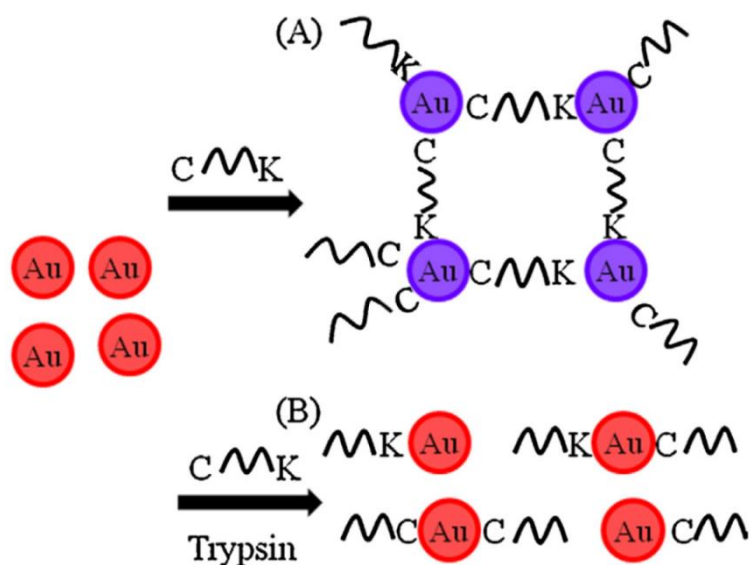


Kuva 15. RDP- (RDP-AuNCs) ja BSA-päällysteisten kultananopartikkeleiden (AuNCs) biojakautuminen hiirien kehossa tunnin kuluttua injektiosta. Adapted from *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10, 2115–2124 with the permission of Dove Medical Press Limited.

Lopuksi Zhang ja Fu⁸⁷ selvittivät RDP-päällysteisten kultananopartikkeleiden toimivuutta hermosolujen kuvantamisessa. Kokeessa hiiriin injektoitiin fluoresoivalla merkkiaineella 6-FAM leimattuja RDP-päällysteisiä kultananopartikkeleita. Kahden tunnin kuluttua injektiosta fluoresenssisignaali paikannettiin hermosolujen solulimasta osoittaen, että RDP-päällysteiset kultananopartikkelit soveltuvat mahdollisesti hermosolujen kuvantamiseen.

Osa oligopeptideistä aiheuttaa kultananopartikkeleiden välittömän aggregaation eikä niitä siten voida käyttää oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden valmistamiseen.³³ Oligopeptidien aiheuttamaa aggregaatiota voidaan kuitenkin hyödyntää tietyn tyyppisissä sovelluksissa. Ding *et al.*⁸⁹ suunnittelivat kultananopartikkeleiden aggregaatioon perustuvan kolorimetrinen kokeen proteaasien ja

niiden inhibiittoreiden havaitsemiseksi. Proteaasit ovat proteiineja pilkkovia entsyymejä, joiden puutteellinen toiminta voi johtaa esimerkiksi haiman sairauksiin.⁹⁰ Ding *et al.*⁸⁹ käyttivät kokeissaan proteaasien mallina trypsiiniä, joka katkaisee oligopeptidit lysiinin ja arginiinin karboksyylihappoterminaalista. Kokeessa sitraattistabiloitujen kultananopartikkeleiden liuokseen lisättiin oligopeptidi YHPQMNPYTKAGGGC, jonka kysteini- ja lysiinisivuketjut aiheuttivat kultananopartikkeleiden välittömän aggregaation ja liuoksen värinmuutoksen punaisesta siniseksi (kuva 16 A). Aggregaatio perustuu kysteinin tioliryhmän vahvaan affiniteettiin kullan kanssa sekä lysiinin positiivisesti varautuneen amiiniryhmän vuorovaikutukseen sitraattipäällysteisen kultananopartikkelin negatiivisesti varautuneen pinnan kanssa. Koska trypsiini katkaisee aminohappoketjun lysiinin karboksyyli-ryhmän kohdalta, trypsiinin läsnä ollessa YHPQMNPYTKAGGGC -oligopeptidi pilkkoutui kahteen osaan, jotka sisälsivät pelkän kysteinin tai lysiinin. Tällöin aggregaatiota ei tapahtunut eikä liuoksen värinmuutosta havaittu (kuva 16 B). Toimivan trypsiinin läsnäolo pystyttiin liuoksen värinmuutoksen kautta havaitsemaan paljaalla silmällä 0.5 nM konsentraatioon asti. Lisäksi Ding *et al.*⁸⁹ osoittivat menetelmän soveltuvuuden potentiaalisten trypsiini-inhibiittoreiden testaamiseen määrittämällä tunnetun trypsiini-inhibiittorin, bentsamidiinihydrokloridin, inhibiittitehokkuuden konsentraation funktiona.



Kuva 16. YHPQMNPYTKAGGGC-oligopeptidin aiheuttama kultananopartikkeleiden aggregaatio ilman trypsiiniä (A) ja trypsiinin aiheuttama oligopeptidin pilkkoutuminen (B). Reprinted from *Sensors and Actuators B: Chemical*, 201, X. Ding *et al.*, Colorimetric protease assay by using gold nanoparticles and oligopeptides, 234–239, Copyright 2014, with permission from Elsevier.

Fytokelatiinit ovat luonnossa esiintyviä oligomeerejä, jotka muistuttavat rakenteeltaan glutationia.⁹¹ Ne koostuvat toistuvasta EC-dipeptidistä, jota seuraa lopuksi glysiini. Muun muassa kasvit, sienet ja levät pystyvät valmistamaan fytokelatiineja fytokelatiinisyntaasientsyymien avulla. Soluissa fytokelatiinit toimivat kelaattoreina, joiden avulla organismit käsittelevät raskasmetalleja. Glutationin ohella myös fytokelatiineja on käytetty funktionaalisten kultananopartikkeleiden valmistuksessa. Politi *et al.*⁹² kiinnittivät kuudesta EC-yksiköstä koostuvia fytokelatiineja PEG-päällysteisten kultananosauvojen pintaan. Koska fytokelatiinit kompleksoivat tehokkaasti metalli-ioneja, fytokelatiinipäällysteisiä kultananotankoja voitiin käyttää lyijyionien konsentraation määrittämiseen vedestä.

Oligopeptidipäällysteisiä kultananopartikkeleita voidaan hyödyntää myös katalyyttisissä prosesseissa.⁹³ Luonnossa kemiallisia reaktioita katalysoivat entsyymit, joissa aktiivisen kohdan funktionaaliset ryhmät ovat proteiinien laskostumisen kautta asettuneet optimaalisesti siten, että ne mahdollistavat kemiallisen reaktion tapahtumisen mahdollisimman suotuisassa konformaatioissa. Entsyymejä jäljittelevien synteettisten molekyylien ongelmana usein on, että yksinkertaiset mallit ovat riittämättömiä kun taas monimutkaisempien rakenteiden syntetisoiminen on vaikeaa. Pengo *et al.*⁹³ valmistivat HF-dipeptidillä funktionalisoiduilla alkaanitioleilla päällystettyjä kultananopartikkeleita, joiden karboksylaatti- ja imidatsoliryhmät ovat keskeisiä estereitä hajottavien entsyymien, esteraasien, aktiivisessa kohdassa esiintyviä funktionaalisia ryhmiä. Tutkimuksessa osoitettiin, että dipeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden katalysoiman esterihydrolyysin reaktionopeus oli 300-kertainen verrattuna pelkän dipeptidin katalysoimaan reaktioon. Tulosten perusteella pääteltiin, että dipeptidien kiinnitys kultananopartikkeleiden pintaan mahdollistaa karboksylaatti- ja imidatsoliryhmien yhtäaikaista toimintaa samaan tapaan kuin luonnossa esiintyvien entsyymien aktiivisessa kohdassa.

3. Yhteenveto

Oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleille on viime vuosien aikana pyritty kehittämään lukuisia lääketieteellisiä sovelluksia. Kultananopartikkeleiden suosio perustuu muun muassa niiden bioinerttyteen sekä suoraviivaiseen ja nopeaan

synteesiprosessiin. Muodostuvien partikkeleiden kokoa ja edelleen koosta riippuvia ominaisuuksia on helppo säädellä reagenssien konsentraation kautta. Lisäksi kultananopartikkeleiden toiminnalliset ominaisuudet voidaan säätää halutunlaisiksi muokkaamalla stabiloivan orgaanisen ligandikerroksen rakennetta. Tähän muokkaukseen on käytettävissä useita eri menetelmiä, kuten ligandin vaihto ja uusien funktionaalisten molekyylien linkittäminen olemassa oleviin funktionaalsiin ryhmiin kemiallisten reaktioiden kautta.

Kultananopartikkelit ovat mielekkäitä lääketieteellisten sovellusten kannalta myös siitä syystä, että niiden optiset ominaisuudet, kuten LSPR ja luminesenssi, mahdollistavat spektroskopisten tekniikoiden ja eri kuvantamismenetelmien käytön. Koska kultananopartikkelit vuorovaikuttavat sähkömagneettisen säteilyn kanssa, niitä voidaan käyttää myös syövän sädehoidon tehostajina.

Monipuolisia muokkausmahdollisuuksia tarjoavan synteetin ja optisten ominaisuuksien ohella kultananopartikkelit toimivat hyvinä kuljetusalustoina lääkeaineille ja muille biologisessa ympäristössä toiminnallisille molekyylielle. Kultananopartikkeleiden pinnan kaarevuus edistää ligandien asettumista biologisesti aktiivisiin konformaatioihin. Lisäksi kultananopartikkeleiden suuri pinta-ala suhteessa tilavuuteen mahdollistaa useiden lääkeaineiden tai funktionaalisten molekyylien kuljetuksen samanaikaisesti.

Biologisten sovellusten kannalta oligopeptidit ovat erinomaisia ligandeja kultananopartikkeleiden funktionalisoimiseen. Niiden perusrakenne muistuttaa proteiinien rakennetta ja mahdollistaa siten vuorovaikutuksen lukuisten eri kehonsisäisten kohteiden kanssa. Tyypillisimpiä kohteita ovat solukalvon reseptorit sekä solun sisällä, kuten tumakalvossa, sijaitsevat proteiinirakenteet. Oligopeptidien aminohappokoostumusta voidaan hallita aminohapon tarkkuudella ja se voidaan suunnitella vastaamaan spesifisesti tiettyjä proteiinirakenteita. Tällaisten tarkasti määritettyjen oligopeptidien synteesi onnistuu nopeasti kiinteä faasi -tekniikalla. Tekniikka mahdollistaa minkä tahansa aminohapposekvenssin syntetisoimisen kulloisenkin tarpeen mukaan.

Tarkasti määriteltyjä aminohapposekvenssejä voidaan käyttää kultananopartikkeleiden sekä niihin kiinnitettyjen lääkeaineiden kohdennetussa kuljetuksessa. Lääkeaineiden kohdennettu kuljetus vähentää lääkkeiden aiheuttamia sivuvaikutuksia. Se on erityisen tärkeää syöpähoitossa, jossa tavoitteena on sairaiden solujen tappaminen vaikuttamatta terveisiin soluihin. Tähän mennessä on tunnistettu useita solukalvon reseptoreiden ja

erityisesti syöpäsolujen pinnalla runsaana esiintyvien reseptoreiden kanssa vuorovaikuttavia oligopeptidejä. Monet näistä on johdettu virusten soluun tunkeutuessaan käyttämistä proteiineista.

Soluun kuljetuksen haasteena on saada kultananopartikkelit vapautumaan solunsisäisistä kalvorakenteista, kuten endosomeista. Osassa tutkimuksista on osoitettu, että tietyillä tuman proteiinirakenteiden kanssa vuorovaikuttavilla oligopeptideillä päällystetyt kultananopartikkelit saavuttavat solujen tuman, mutta mekanismit, joilla kultananopartikkelit pakenevat endosomeista, eivät useinkaan ole selvillä.

Solukalvolle ohjaavien oligopeptidien ohella yksi suosituimmista kultananopartikkeleiden päällystämiseen käytetyistä oligopeptideistä on glutationi. Glutationin suosio perustuu sen luontaiseen esiintymiseen soluissa sekä sen kykyyn suojata kultananopartikkeleita epäspesifiseltä plasmaproteiinien adsorptiolta. Toinen paljon kultananopartikkeleiden päällystyksessä käytetty oligopeptidi on synteettinen CALNN, joka suunniteltiin optimaaliseksi systemaattisen aminohapposekvenssin varioinnin kautta. Koska CALNN ei itsessään ole toiminnallinen oligopeptidi, siitä on myöhemmin kehitelty erilaisia toiminnallisia johdannaisia.

Syöpähoidon ja kohdenetun lääkeaineiden kuljetuksen ohella oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden toimivuutta on testattu muun muassa biomolekyylien tunnistamiseen liittyvissä kolorimetrisissä analyyseissä. Vaikka oligopeptidipäällysteisillä kultananopartikkeleilla on paljon potentiaalisia sovelluksia, suurin osa näistä on edelleen tutkimusvaiheessa. Osassa lääketieteellisistä sovelluksista on edetty *in vivo* kokeisiin laboratorioissa, mutta tämän kirjallisuuskatsauksen perusteella kliiniseen tutkimukseen on edelleen matkaa.

KOKEELLINEN OSA

4. Työn tarkoitus

Erikoistyön aihe on osa Jyväskylän yliopiston Nanoscience Centerissä tehtävää kultananopartikkeleiden poikkitieteellistä tutkimusta. Työn tarkoituksena oli toistaa kirjallisuudessa esitettyä amidisynteesiä⁹⁴ ja selvittää sen toimivuutta osana oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden valmistusprosessia.

Laitoksella on aiemmin valmistettu $Au_m(pMBA)_n$ [(m, n) = (102, 44) ja (144, 60)] kultananopartikkeleita,⁶ joita päällystävän 4-merkaptobentsoehapon vapaaseen karboksyylihapporyhmään voidaan teoriassa liittää sopivan funktionaalisen ryhmän omaavia molekyyliä, kuten aminohappoja tai niiden muodostamia oligopeptidejä. Oligopeptidit ovat 2–20 aminohapon muodostamia ketjuja, joissa molekyyliä kytkee toisiinsa peptidisidos.

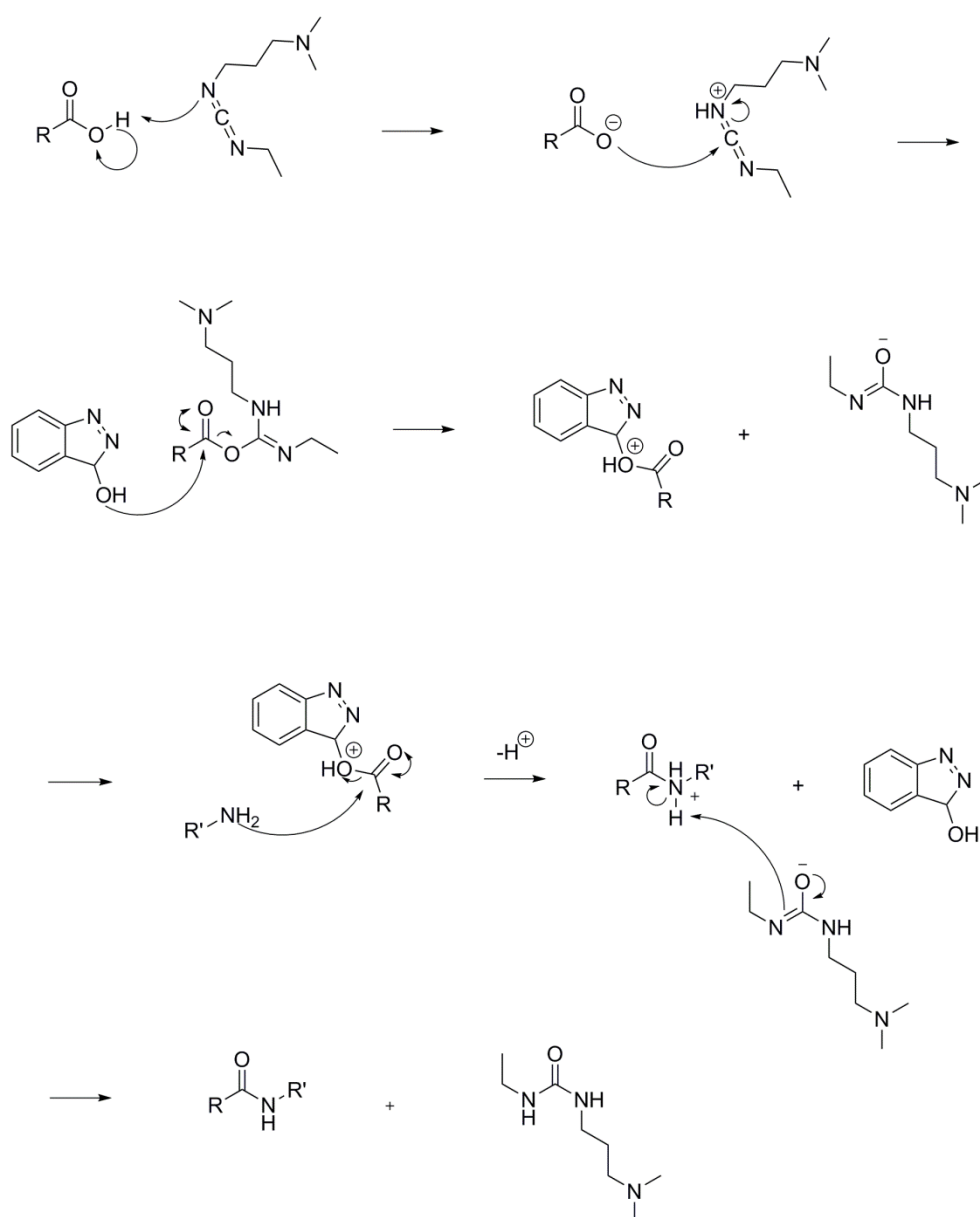
Oligopeptidien rakenne on verrattavissa pidemmistä polypeptideistä koostuvien proteiinien rakenteeseen, jotka solussa vastaavat lukuisten tärkeiden toimintojen ohella molekyylien ja partikkeleiden kuljetuksesta solukalvon läpi. Oligopeptidien ja proteiinien samankaltaisesta rakenteesta johtuen oligopeptidejä voidaan käyttää tunnistamaan erilaisia reseptoreita solukalvon pinnalla ja niiden on arveltu avustavan nanopartikkeleiden pääsyä sisälle soluun.^{42,64} Oligopeptidipäällysteisiä kultananopartikkeleita voitaisiin mahdollisesti käyttää tulevaisuudessa muun muassa lääkeaineiden kuljetuksessa⁵¹ ja syövän sädehoidossa⁴².

Työssä testattiin myös etyyliesteri- ja *N*-(9-fluorenyylimetoksikarbonyyli)-suojausryhmän (Fmoc-suojausryhmä) purkua sekä yritettiin kiteyttää valmistettuja yhdisteitä. Lisäksi harjoiteltiin erilaisten spektrien mittausta käyttämällä tuotteiden karakterisointiin NMR:n ohella myös IR- ja UV-VIS-spektroskopiaa.

5. Reaktiomekanismit

5.1 Amidin valmistaminen aminohapon esteristä HOBt- ja EDC-katalysoidulla nukleofiilisella substituutiolla

Karboksyylihaposta ja aminohapon esteristä voidaan valmistaa amidi 1-hydroksibentsotriatsolihydraatin (HOBt) ja *N*-(3-dimetyyliaminopropyli)-*N'*-etylikarbodiimidin (EDC) katalysoimalla nukleofiilisella substituutioreaktiolla (kuva 17).



Kuva 17: HOBt:n ja EDC:n katalysoiman amidinmuodostuksen reaktiomekanismi^{95a}

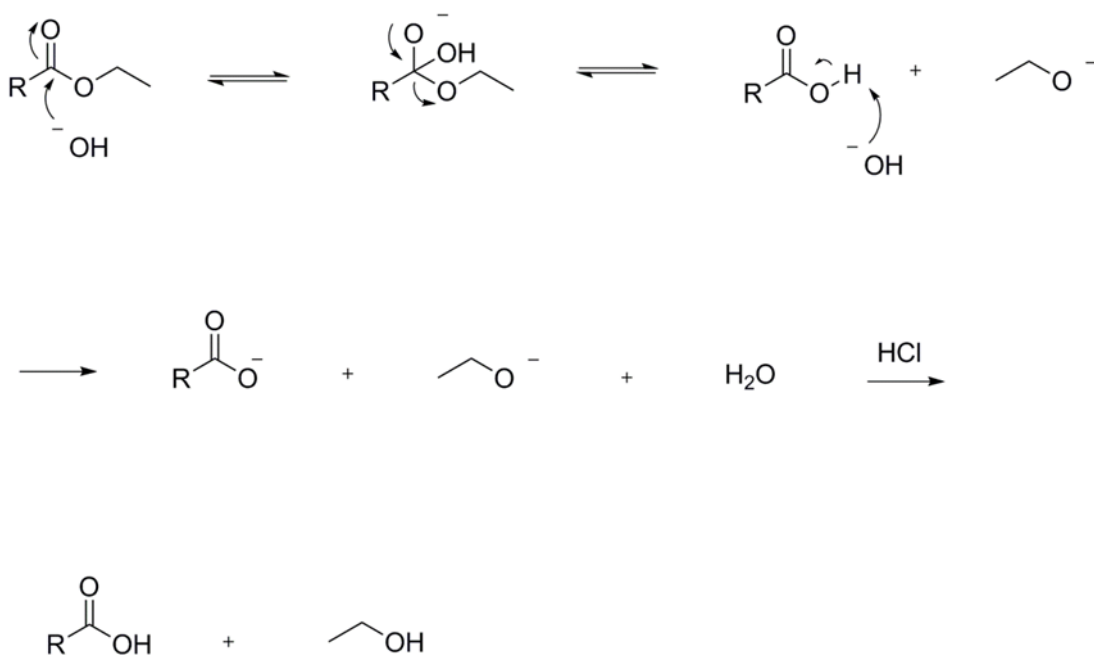
Reaktiossa EDC toimii emäksenä aktivoiden karboksyylihapon karboksyyliiryhmän viemällä siitä protonin.^{95a} Muodostunut karboksylaatti-ioni reagoi edelleen EDC:n kanssa nukleofiilisellä additiolla muodostaen esterin, jossa on hyvä lähtevä ryhmä. HOBt reagoi nukleofiilisellä substituutiolla kyseisen esterin karbonyylihiileen, jolloin vapautuu sivutuotteena *N*-[3-(dimetyyliamino)propyyli]-*N'*-etyyliureaa. Lopuksi aminohappo reagoi nukleofiilisellä substituutiolla hapon ja HOBt:n esterin kanssa muodostaen amidin HOBt:n toimiessa lähtevänä ryhmänä.

Tässä työssä valmistettiin kolmenlaisia amideja käyttämällä lähtöaineena L-alaniinietyyliesterihydrokloridia toisen lähtöaineen ollessa bentsoehappo, *N*-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)-L-fenyylialaniini (Fmoc-fenyylialaniini) tai 4,4-ditiolibisbentsoehappo. Edellä kuvattu mekanismi edellyttää, että käytetyn aminohapon aminoryhmä on reaktioseoksessa neutraalissa muodossa. Reaktion etenemiseksi L-alaniinietyyliesterihydrokloridin täytyy siis menettää hydrokloridisuojauksensa ennen kuin sen aminoryhmä voi toimia nukleofiilina.

Työssä havaittiin, että reaktio etenee, vaikka aminohapon etyyliesterin hydrokloridisuojausta ei pureta ennen käyttöä. Tämä voisi selittyä sillä, että reaktioseoksessa oleva HOBt kykenee sitomaan vetykloridihappoa sp^2 -hybridisoituneen typen avulla kuten pyridiini, joka tunnetusti muodostaa vetykloridihapon kanssa suolan.⁹⁶ Tällöin osa aminohapon etyyliesteristä olisi vapaa reagoimaan edelleen.

5.2 Aminohappojen α -karboksyyli­ryhmän etyyli­esterisuo­jauksen purku emäskatalysoidulla hydrolyysillä

Aminohapon α -karboksyyli­ryhmän etyyli­esterisuo­jau­sus voidaan purkaa emäskatalysoidulla hydrolyysillä, jossa emäksenä voi toimia esimerkiksi natriumhydroksidi (kuva 18).



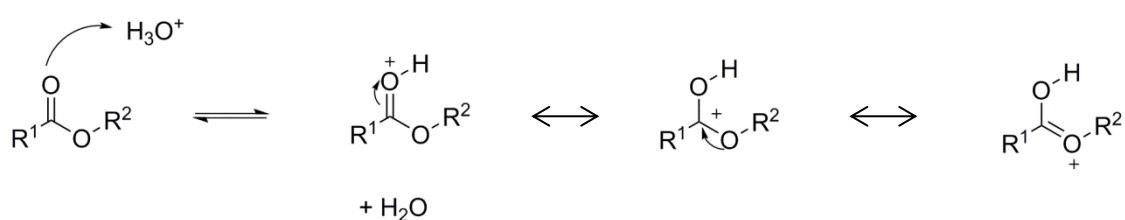
Kuva 18: Emäskatalysoidun esterihydrolyysin reaktiomekanismi^{95b}

Tässä työssä etyyli­esterisuo­jauksen purkua testattiin aluksi L-alaniini­etyyli­esterihydri­kloridilla, jonka jälkeen suo­jauksen purku suoritettiin myös N-alaniini­etyyli­esteri-4,4-ditiolibis­bentsoehapolle. Emäskatalysoidussa esterihydrolyysissä nukleofiilinen hydroksidi-ioni reagoi esteriryhmän elektrofiilisen karbonyylihiilen kanssa.^{95b} Muodostuva tetraedrinen väli­tuote voi palautua takaisin esteriksi tai muodostaa karboksyyli­hapon ja alkoholin. Emäksisissä olosuhteissa karboksyyli­happo deprotonoituu välittömästi muodostaen karboksylaattisuo­lan. Koska deprotonaatio on irreversiibeli, reaktion tasapaino siirtyy suosimaan hydrolyysituotetta. Karboksyyli­ryhmän uudelleenprotonointi tapahtuu lisäämällä reaktioseokseen happoa.

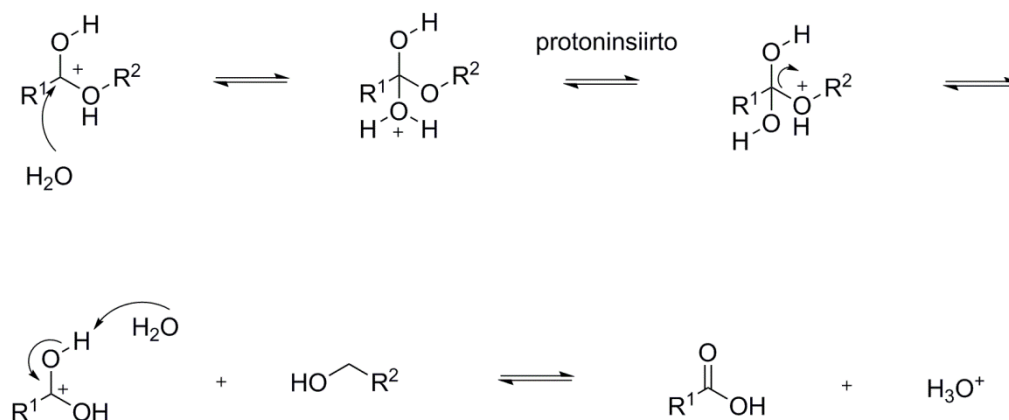
5.3 Aminohappojen α -karboksyyliiryhmän etyyliesterisuojuuksen purku happokatalysoidulla hydrolyysillä

Aminohapon α -karboksyyliiryhmän etyyliesterisuojaus voidaan purkaa happokatalysoidulla hydrolyysillä, jossa happona voi toimia esimerkiksi vetykloridihappo (kuva 19).

Vaihe 1



Vaihe 2

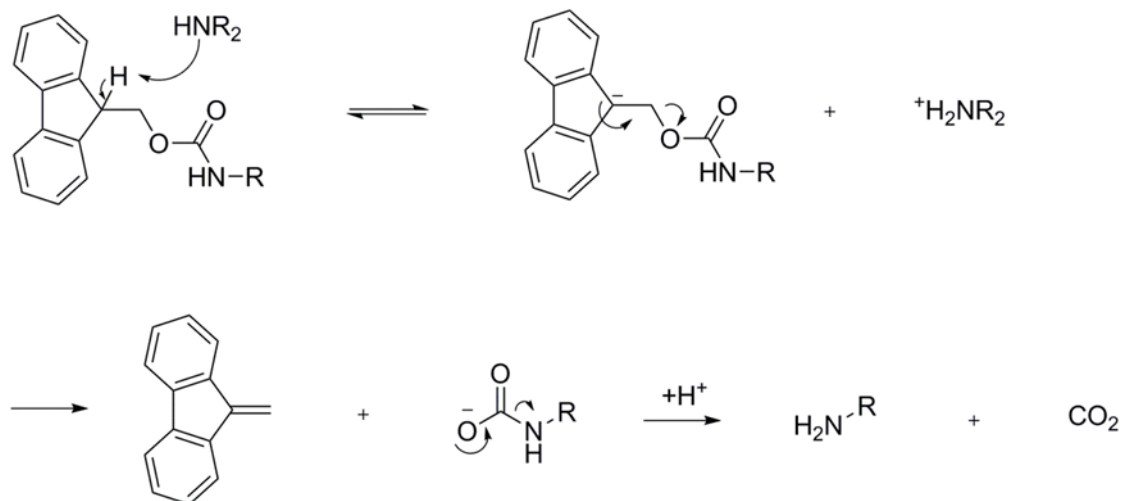


Kuva 19. Happokatalysoitu esterihydrolyysin reaktiomekanismi^{95c}

Tässä työssä *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuojuuksen purkua testattiin sekä hydrokloridihapolla että rikkihapolla. Happokatalysoidussa esterihydrolyysissä karbonyyliiryhmä protonoituu, jolloin karbonyylihiili saa positiivisen osittaisvarauksen.^{95c} Tällöin vesi pystyy toimimaan nukleofiilina. Protoninsiirron seurauksena molekyylistä irtoaa alkoholi. Reaktio on täysin reversiibeli, mutta ylimäärä vettä siirtää tasapainon karboksyylihapo- ja alkoholituotteiden puolelle.

5.4 Emäskatalysoitu aminohappojen α -aminoryhmän Fmoc-suojauksen purku

Aminohppojen α -aminoryhmän Fmoc-suojauksen purku tapahtuu emäksisissä olosuhteissa deprotonaation ja eliminaation kautta (kuva 20). Peptidisynteesissä emäksenä käytetään tavallisesti amidiemäksiä kuten piperidiiniä.⁹⁷



Kuva 20: Fmoc-suojausryhmän purkaminen amiiniemäksellä^{95d}

Tässä työssä Fmoc-suojauksen purkua testattiin Fmoc-fenyyialaniinilla. Fmoc-ryhmä sisältää happaman protonin, joten ryhmä deprotonoituu emäksisissä olosuhteissa.^{95d} Tätä seuraa eliminaatio, jossa aromaattisesta anionista muodostuu dibentsofulveenia. Aminoryhmä vapautuu, kun karboksylaattiryhmä irtoaa hiilidioksidina. Dibentsofulveeni voi edelleen reagoida emäksisen amidin kanssa.⁹⁸

6. Käytetyt laitteet, menetelmät ja reagenssit

Työssä käytettiin Jyväskylän yliopiston orgaanisen kemian laboratoriossa kuivattua dikloorimetaania (DCM) ja dimetyyliformamidia (DMF). Liuottimet säilytettiin argonilmakehässä lukuun ottamatta synteisiä A1. Synteeseissä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 3. Synteesin D1 tuotteen kromatografisessa puhdistuksessa käytettiin Combi Flash -laitetta. Synteesituotteiden ^1H , ^{13}C ja HMQC NMR-spektrit mitattiin Bruker AV 300 FT NMR -spektrometrillä. Mittaukset suoritettiin 26 °C:ssa ja liuottimena käytettiin CDCl_3 :a (synteisit A1–A3, B1–B2, D1–D4, E1 ja F1), $\text{DMSO-}d_6$:a (synteisit C1, E2–E3 ja F2), MeOD:a (synteesi F2) tai D_2O :a (synteesi E1). Valmistettujen tuotteiden spektrien assignoinnissa käytettiin apuna bentsoehaposta mitattuja ^1H ja ^{13}C NMR-spektrejä sekä L-alaniinietyyliesteristä ja Fmoc-L-fenyylialaniinista mitattuja HMQC NMR-spektrejä. Sulamispisteet määritettiin Stuart Melting Point Apparatus SMP30 -laitteella. Massaspektrit mitattiin Qstar Elite -laitteella. Kiderakenteen määrittä tutkijatohtori Kaisa Helttunen Bruker Kappa CCD -diffraktometrillä.

Synteesien A3 ja D1 tuotteet liuotettiin asetonitriiliin ja liuoksista valmistettiin 4–5 sopivan vahvuista laimennosta siten, että niiden absorbanssit olivat alle 1. Laimennosten absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä (Lambda 850 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer). Tulokset sovitettiin suoraksi, jossa absorbanssi esitettiin konsentraation funktiona ja suoran kulmakertoimesta määritettiin tuotteiden molaarinen absorptiokerroin ϵ .

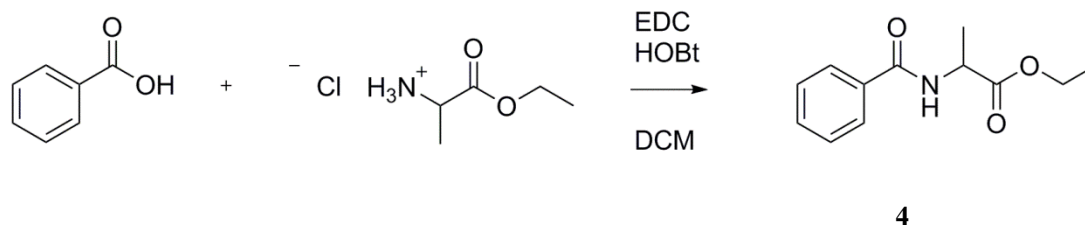
Taulukko 3. Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus (%)
L-alaniinietyyliesterihydrokloridi	Fluka Chemika	99
bentsoehappo	Merck	≥ 99
dikloorimetaani	VWR Prolabo Chemicals	99,9
<i>N</i> -(3-dimetyyliaminopropyli)- <i>N</i> '-etyylikarbodiimidi	Aldrich	≥97,0
etanoli	ETAX	absoloiitu
Fmoc-fenyylialaniini	Aldrich	98
1-hydroksybentsotriatsolihydraatti	Aldrich	≥97,0
litiumhydroksidi	Merck	98 %
4-merkaptobentsoehappo	Aldrich	99
metanoli	J.T. Baker	>99,8
natriumhydroksidi	AnalaR Normapur	99
natriumsulfaatti	Sigma-Aldrich	≥99,0
piperidiini	Sigma-Aldrich	99
rikkihappo	Fluka	95–97 %*
silika 60	Merck	
piidioksidi	Supelco Analytical	
tetrahydrofuraani	Sigma-Aldrich	≥99,9
vetykloridihappo	Sigma-Aldrich	37 %*
Muut reagenssit	Valmistaja	Pitoisuus
I ₂ /EtOH-liuos	Jaakko Koivisto	kylläinen

* Pitoisuus

7. Synteetit

7.1 *N*-bentsoyyli-*L*-alaniinietyyliesteri



Yleinen ohje⁹⁴

Jäähdytettiin kuivaan dikloorimetaanin (20 ml) liuotettua bentsoehappoa (109.0 mg, 0.89 mmol) jäähauteeseen asetetussa, CaCl₂-putkella varustetussa kaksikaulakolvissa 0 °C:ksi samalla sekoittaen. Seokseen lisättiin EDC:a (163 µl, 0.90 mmol) ja HOBt:ta (122.0 mg, 0.90 mmol). Sekoitusta jatkettiin 0 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen seokseen lisättiin *L*-alaniinietyyliesterihydrokloridia (138.0 mg, 0.90 mmol). Reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitusta jatkettiin yön yli reaktion loppuun saattamiseksi. Reaktioseos siirrettiin erotussuppiloon ja pestiin 2 M vetykloridihapolla, kylläisellä NaHCO₃-liuoksella, vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Liuotin haihdutettiin pyöröhaiduttimella. Tuote erotettiin pylväskromatografialla käyttäen silikapylvästä ja eluenttina dikloorimetaani-metanoli 95:5 seosta.

Synteesi A1

Synteesi A1 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti lukuun ottamatta pylväskromatografiaerotusta, jossa eluenttina käytettiin DCM:MeOH seosta 9:1. Pylväskromatografialla ei kuitenkaan onnistuttu erottamaan toisistaan kahta nopeinten liikkuvaa komponenttia, joten seuraavissa synteeseissä A2–A3 käytettiin yleisen ohjeen mukaista liuotinsuhdetta. Tuotteesta mitattiin ¹H NMR-spektri, joka vastasi hyvin aiemmin *N*-bentsoyylialaniinietyyliesterille määritettyjä spektrejä^{99,100}. Tuotteen sulamispisteeksi määritettiin 92–93 °C (kirjallisuusarvo: 76–77 °C⁹⁹). Sulamispiste määritettiin mahdollisesti liian kosteasta näytteestä, sillä erä, josta se otettiin, ei ollut ehtinyt kuivua yön yli. Kosteus on saattanut myös vääristää saantoa, joka oli 121.0 mg (62 %) valkoista sakkaa.

Synteesi A2

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaan, mutta kaksinkertaisilla ainemäärillä (taulukko 4). Lisäksi CaCl₂-putki korvattiin argonilmakehällä. Siirrettäessä tuotetta pylvääseen osa tuotteesta ei liennut ja pieni erä tuotetta jäi kolviin. Sekä kolviin jääneestä erästä (A2b) että pylväästä kerätyistä fraktioista (A2a) mitattiin ¹H ja ¹³C -NMR spektrit. Spektrit vastasivat hyvin aiemmin *N*-bentsoyylialaniinietyyliesterille määritettyjä spektrejä,^{99,100} mutta fraktioista mitatussa ¹H NMR-spektrissä amidiprotonin piikki ei erottunut selkeästi erillisenä omana piikkinään kuten muissa spektreissä vaan oli siirtynyt aromaattisten siirtymien kylkeen (Liite 2). Pylväästä kerätyn tuotteen sulamispisteeksi määritettiin 99–100 °C. Kolviin jääneestä erästä määritettiin massaspekttri, joka on esitetty liitteessä 3. Synteesin saanto pylväskromatografian jälkeen oli 289.0 mg (79 %) lähes valkoista sakkaa.

Synteesi A3

Synteesi suoritettiin yleisen ohjeen mukaan, mutta CaCl₂-putki korvattiin argonilmakehällä. Pesujen jälkeen tuote havaittiin ohutlevykromatografialla puhtaaksi eikä pylväskromatografiaerottelua suoritettu. Tuotteesta määritettiin sulamispiste (98–99 °C) sekä mitattiin IR-, ¹H ja ¹³C -NMR spektrit, jotka vastasivat hyvin aiemmin *N*-bentsoyylialaniinietyyliesterille määritettyjä spektrejä^{99, 100}. IR-spektrissä havaittiin odotusten mukaisesti amidi (3346.93 cm⁻¹), sekä esterin ja amidin karbonyyliryhmät (1742.07 cm⁻¹, 1639.57 cm⁻¹). Tuotteen absorbanssi mitattiin UV-VIS spektrofotometrillä 0.35 mM, 0.61 mM, 0.91 mM ja 1.21 mM vahvuisista liuoksista. Mittausten perusteella tuotteelle määritettiin molaarinen absorptiokerroin. Suoran sovitus on esitetty liitteessä 4. Tuote kiteytettiin kloroformi-heksaanista ja tuotteen kiderakenne määritettiin (liite 5); kuva 21. Synteesin saanto oli 96.4 mg (53 %) lähes valkoista sakkaa.

Taulukko 4. Yhteenveto synteeseistä A1–A3

Synteesi	Reagenssit	Käytetty määrä (mmol)	Saanto (%)	Sulamis-piste (°C)	MS
A1	L-alaniinietyyliesterihydrikloridi Bentsoehappo EDC HOBt	0.90 0.89 0.90 0.90	62	92–93	
A2	L-alaniinietyyliesterihydrikloridi Bentsoehappo EDC HOBt	1.81 1.65 1.80 1.80	79	99–100	222.1128 [M+H] ⁺
A3	L-alaniinietyyliesterihydrikloridi Bentsoehappo EDC HOBt	0.90 0.83 0.90 0.90	53	98–99	

$M(C_{12}H_{15}NO_3) = 221.3 \text{ g/mol}$

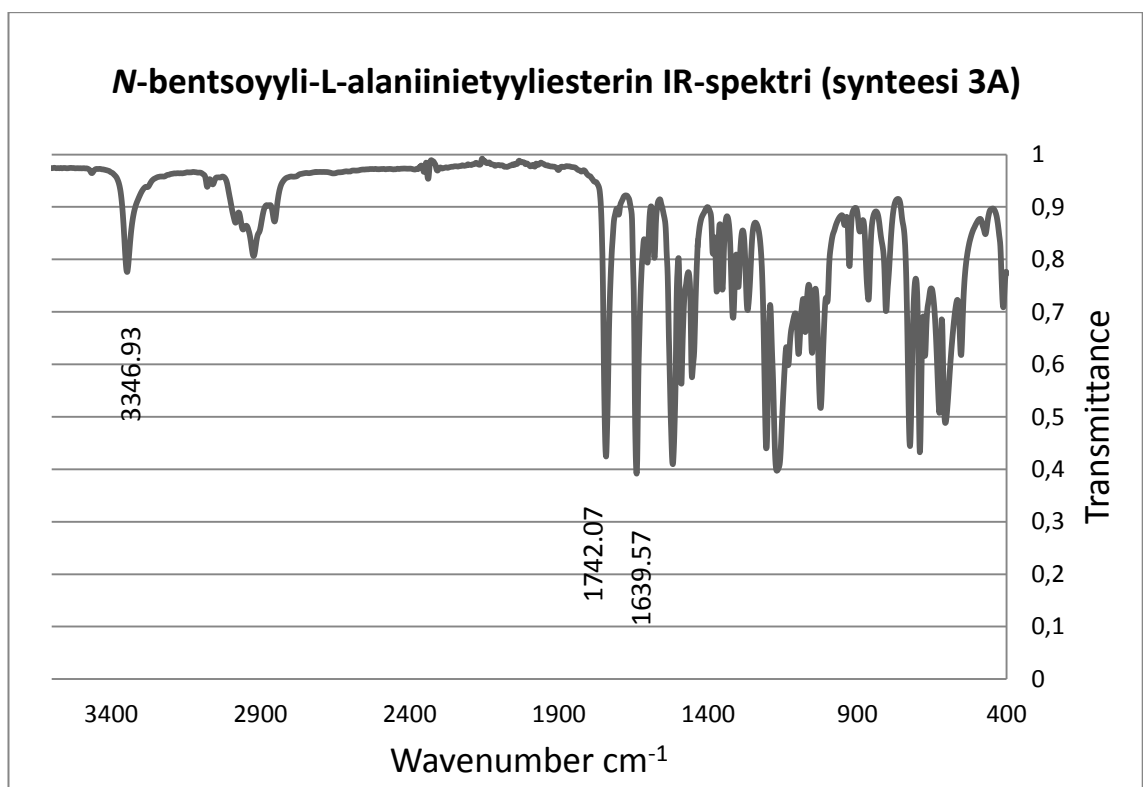
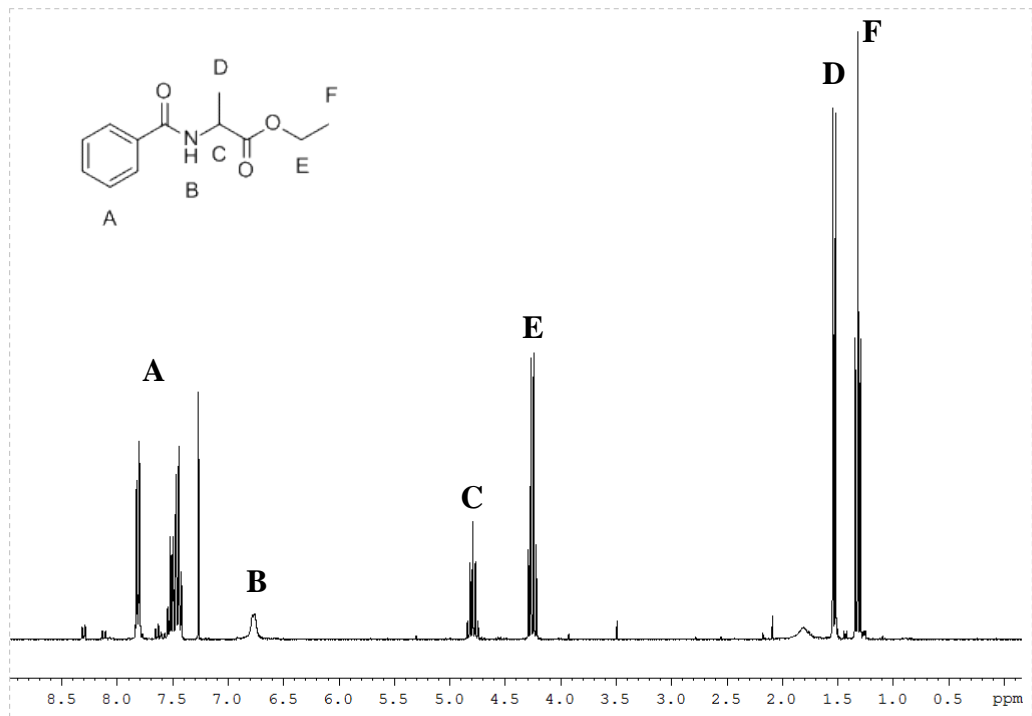
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.8\text{--}7.4$ (**A**, m, 5H), 6.8 (**B**, d, 1H, $J = 6 \text{ Hz}$), 4.8–4.7 (**C**, quint, 1H, $J = 6.3 \text{ Hz}$), 4.3–4.2 (**E**, q, 2H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.5 (**D**, d, 3H, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 1.3 (**F**, t, 3H, $J = 7.2 \text{ Hz}$) ppm

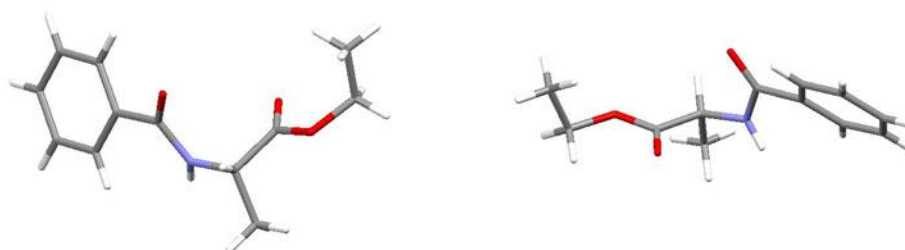
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) $\delta = 173.1, 166.9, 133.8, 131.4, 128.3, 127.0, 61.29, 48.44, 18.03, 13.96$ ppm

MS: m/z 222.1128 [M+H]⁺

IR: 3346.93 cm⁻¹, 3078.20 cm⁻¹, 2983.36 cm⁻¹, 2922.85 cm⁻¹, 2852.77 cm⁻¹, 2338.25 cm⁻¹, 2307.03 cm⁻¹, 1742.07 cm⁻¹, 1639.57 cm⁻¹, 1518.49 cm⁻¹

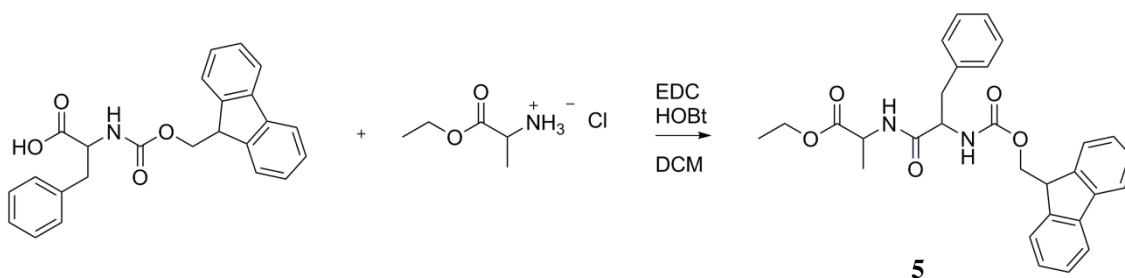
$\epsilon = 0,6679 \text{ l/(mM)}$





Kuva 5. *N*-bentsoyyli-*L*-alaniinietyyliesterin kiderakenne kuvattuna kahdesta eri suunnasta

7.2 *N*-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)-*L*-fenyylialaniini-*L*-alaniinietyyliesteri



Yleinen ohje⁹⁴

Jäähdytettiin kuivaan dikloorimetaaniin (20 ml) liuotettua Fmoc-*L*-fenyylialaniinia (387.0 mg, 0.72 mmol) jäähauteeseen asetetussa kaksikaulakolvissa argon-ilmakehässä 0 °C:ksi samalla sekoittaen. Seokseen lisättiin EDC:a (120 µl, 0.72 mmol) ja HOBt:a (135.0 mg, 0.72 mmol). Sekoitusta jatkettiin 0 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen seokseen lisättiin *L*-alaniinietyyliesterihydrokloridia (154.0 mg, 0.67 mmol). Reaktioseoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan ja sekoitusta jatkettiin yön yli reaktion loppuun saattamiseksi. Reaktioseos siirrettiin erotussuppiloon ja pestiin 2 M vetykloridihapolla, kylläisellä NaHCO₃-liuoksella, vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Tuote eristettiin pylväskromatografialla käyttäen eluenttina dikloorimetaani-metanoli 95:5 seosta.

Synteesi B1

Synteesi B1 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti. Osa raakatuotteesta menetettiin pesun aikana erotussuppilon auki unohtuneen hanan vuoksi, mikä selittää alhaisen saantoprosentin. Tuotteen sulamispisteeksi määritettiin 185.4–186.7 °C ja tuotteesta mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit. ^{13}C NMR-spektrissä esiintyi ylimääräistä signaalia siirtymillä 58.34 ppm ja 29.64 ppm. Lisäksi ^{13}C NMR-spektrissä nähtiin signaali vain kahdesta karbonyylihiilestä. Myös ^1H NMR-spektrissä esiintyi tuntematon kvartetti (3.7 ppm). Tuotteesta mitattu massaspektri, joka on esitetty liitteessä 6, antoi kuitenkin oletetun massan. Synteesin saanto oli 73.0 mg (22 %) valkoista sakkaa.

Synteesi B2

Synteesi B2 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti. Käytetyt ainemäärät on esitetty taulukossa 5. Tuotteen sulamispisteeksi määritettiin 188–189 °C ja tuotteesta mitattiin IR-, ^1H , ^{13}C ja HMQC NMR-spektrit. ^{13}C NMR-spektrissä havaittiin synteesistä B1 poiketen kaikki kolme karbonyylihiiltä. Synteesin B1 ^{13}C ja ^1H NMR-spektreissä esiintyneitä ylimääräisiä signaaleja siirtymillä 58.34, 29.64 ja 3.7 ppm ei havaittu synteesin B2 spektreissä. Tästä pääteltiin, että synteesin B2 tuote oli puhtaampaa. Puhtaampaan tuotteeseen viittasi myös korkeampi sulamispiste kuin synteesin B1 tuotteella. Tuotteen HMQC-spektriä, joka on esitetty liitteessä 7, käytettiin protonispektrien piikkien assignoinnin helpottamiseksi. Aromaattisen alueen tulkinnassa käytettiin lisäksi apuna Fmoc-L-fenyylialaniinista mitattua HMQC NMR-spektriä. Tuotteen IR-spektrissä havaittiin oletusten mukaisesti amidi (3298.23 cm^{-1}) sekä esterin ja amidin karbonyyliryhmät (1735.96 cm^{-1} , 1693.64 cm^{-1}). Tuotetta yritettiin kiteyttää kloroformi-heksaani ja THF-heksaani seoksista tuloksetta. Synteesin saanto oli 156.0 mg (49 %) valkoista sakkaa.

Taulukko 5. Yhteenveto synteeseistä B1–B2

Synteesi	Reagenssit	Käytetty määrä (mmol)	Saanto (%)	Sulamis-piste (°C)	MS
B1	L-alaniinietyyliesteri-hydrikloridi	0.67	22	185.4–186	509.2022 [M+Na] ⁺
	Fmoc-fenyylialaniini	0.72			
	EDC	0.72			
	HOBt	0.72			
B2	L-alaniinietyyliesteri-hydrikloridi	0.65	49	188–189	
	Fmoc-fenyylialaniini	0.72			
	EDC	0.71			
	HOBt	0.72			

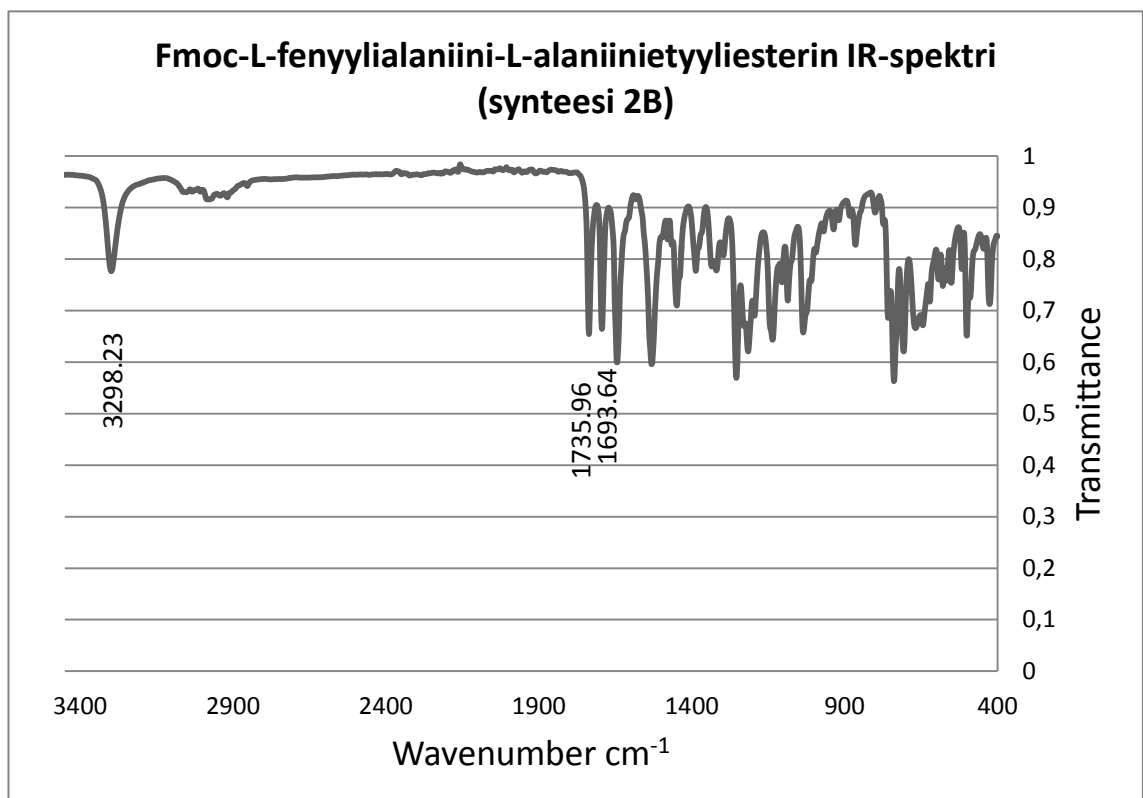
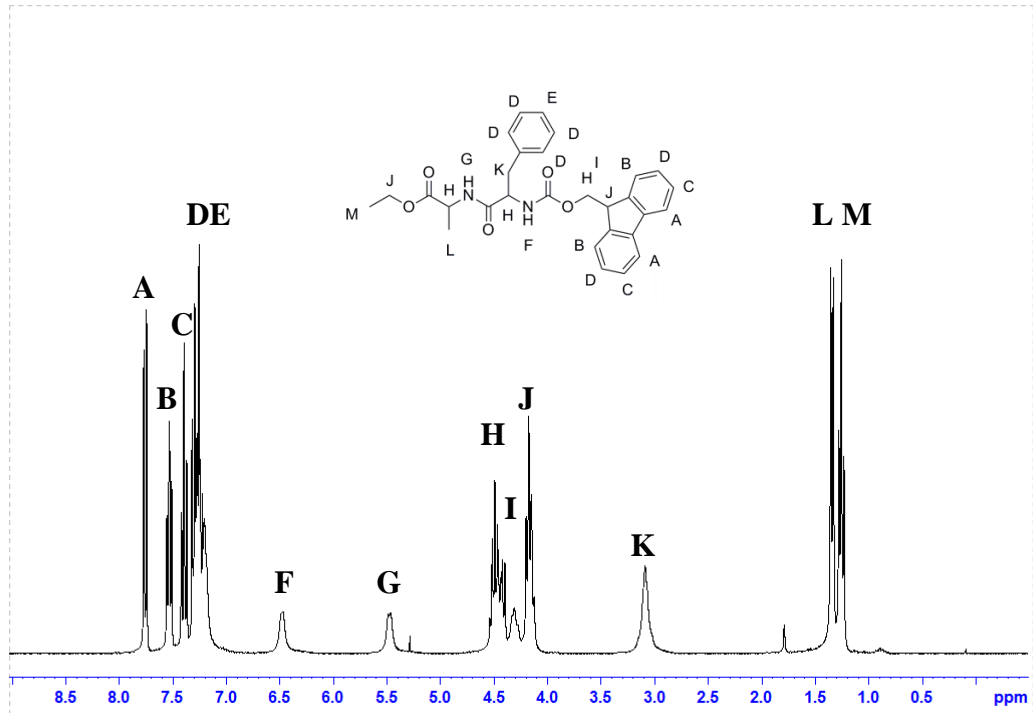
$M(C_{12}H_{15}NO_3) = 486.6 \text{ g/mol}$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.8$ (**A**, d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.6–7.5 (**B**, t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 7.4 (**C**, t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.3 (**D**, m, 6H), 7.2 (**E**, m, 1H), 6.5 (**F**, d, 1H), 5.5 (**G**, d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 4.5–4.4 (**H**, m, 3H, $J = 7.2$ Hz), 4.3 (**I**, t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 4.2–4.1 (**J**, q, 3H, $J = 6.9$), 3.1 (**K**, s, 2H), 1.4–1.3 (**L**, d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.3–1.2 (**M**, t, $J = 7.2$ Hz) ppm

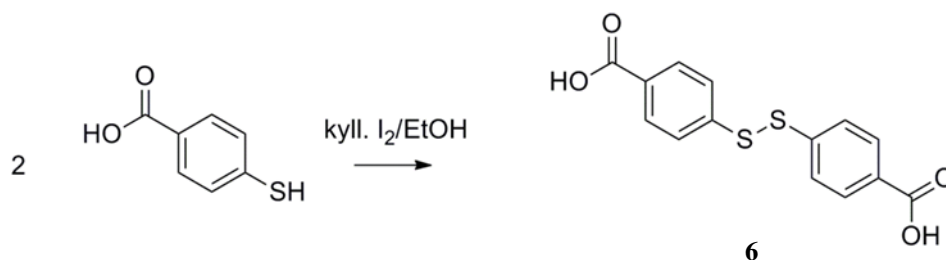
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) $\delta = 172.3, 170.3, 155.8, 143.7, 141.2, 136.2, 129.3, 128.6, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 67.06, 61.45, 55.97, 48.22, 47.06, 38.62, 18.28, 14.05$ ppm

MS: m/z 509.2022 [M+Na]⁺

IR: 3298.23 cm⁻¹, 2977.85 cm⁻¹, 2188.79 cm⁻¹, 1735.96 cm⁻¹, 1693.64 cm⁻¹, 1644.22 cm⁻¹, 1530.76 cm⁻¹



7.3 4,4-Ditiolibisbentsoehappo



Yleinen ohje¹⁰²

4-merkaptobentsoehappo liuotettiin (102.0 mg, 0.66 mmol) etanoliin (10 ml) ultraäänihauteessa. Lisättiin seokseen kylläistä I₂/EtOH-liuosta huoneenlämmössä samalla sekoittaen, kunnes liuos jäi keltaiseksi. Annettiin reagoida huoneenlämmössä sekoittaen 30 minuuttia. Muodostunut valkoinen sakka suodatettiin imusuodatuksella ja kuivattiin yön yli vakuuminjassa.

Synteesi C1

Synteesi C1 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti. Tuotteesta mitattiin ¹H ja ¹³C NMR-spektrit. Tuotteen saanto oli 73.4 mg (73 %) valkoista sakkaa.

Synteesit C2–C4

Synteesit C2–C4 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti, mutta noin kaksinkertaisilla ainemäärillä. Käytetyt ainemäärät ja niitä vastaavat saannot on esitetty taulukossa 6. Eroihin synteesien C1–C4 saannoissa on vaikuttanut todennäköisesti lisätyn jodiliuoksen määrä, jota ei mitattu tarkasti vaan lisäyksen tarve arvioitiin joka synteesikerralla reaktioseoksen värinmuutoksen perusteella. Tuotteita ei analysoitu, vaan ne käytettiin suoraan kuivauksen jälkeen seuraavaan synteesiin.

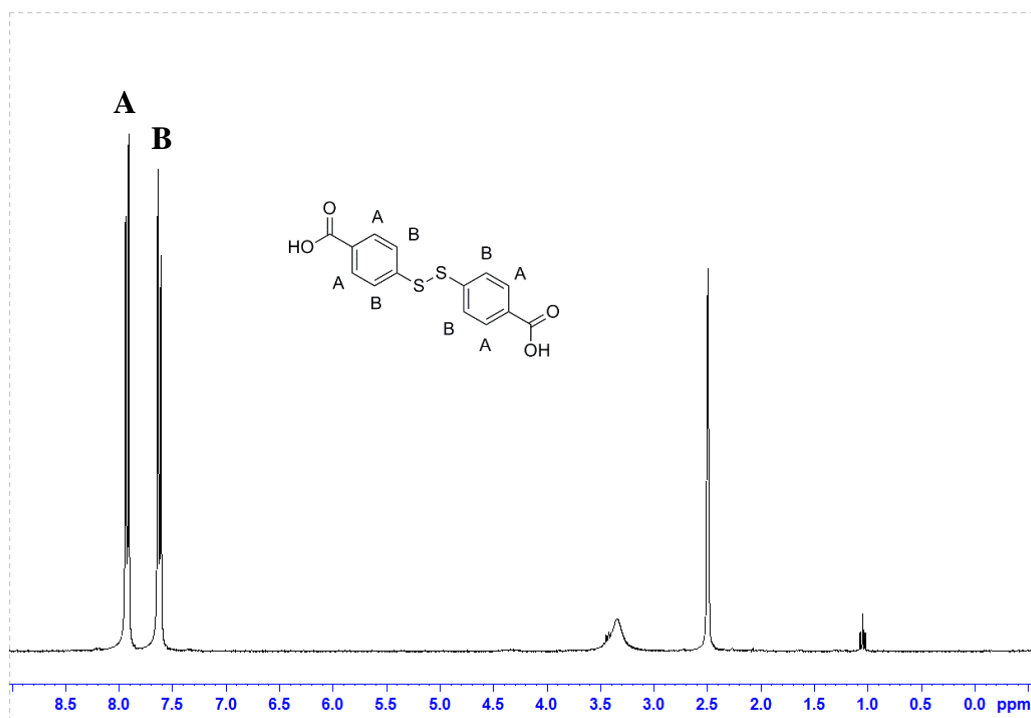
Taulukko 6. Yhteenveto synteeseistä C1–C4

Synteesi	Reagenssit	Käytetty määrä (mmol)	Saanto (%)
C1	4-merkaptobentsoehappo	0.66	73
C2	4-merkaptobentsoehappo	1.29	82
C3	4-merkaptobentsoehappo	1.30	67
C4	4-merkaptobentsoehappo	1.34	87

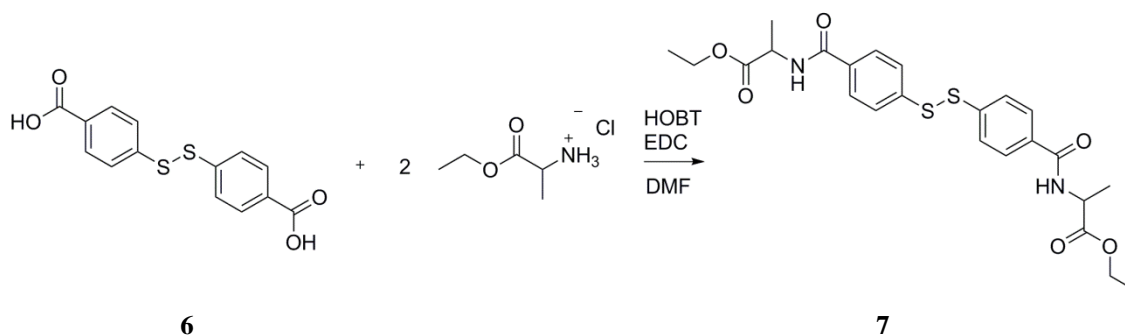
$M(C_{12}H_{15}NO_3) = 306.4 \text{ g/mol}$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.9$ (**A**, d, 4H, $J = 8.5$ Hz), 7.6 (**B**, d, 4H, $J = 8.5$ Hz) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 166.6, 140.8, 130.3, 129.7, 126.1$ ppm



7.4 *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehappo



Yleinen ohje⁹⁴

Jäähdytettiin kuivaan dimetyyliformamidiin (20 ml) liotettua 4,4-ditiolibisbentsoehappoa (**6**, 73.4 mg, 0.24 mmol) jäähauteeseen asetetussa kaksikaulakolvissa argon-ilmakehässä 0 °C:ksi samalla sekoittaen. Seokseen lisättiin EDC:a (86 µl, 0.48 mmol) ja HOBt:a (65.2 mg, 0.48 mmol). Sekoitusta jatkettiin 0 °C:ssa tunnin ajan, jonka jälkeen seokseen lisättiin L-alaniinietyyliesterihydrokloridia (74.6 mg, 0.49 mmol). Reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitusta jatkettiin yön yli reaktion loppuun saattamiseksi. Liuotin haihdutettiin pois pyöröhaihduttimella. Tuote liuotettiin uudelleen 10 ml:aan dikloorimetaania, siirrettiin erotussuppiloon ja pestiin 2 M vetykloridihapolla, kylläisellä NaHCO₃-liuoksella, vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Tuote erotettiin Flash-kromatografialla käyttäen eluenttina dikloorimetaani-metanoli 95:5 seosta.

Synteesi D1

Synteesi D1 suoritettiin yleisen ohjeen mukaan. Ennen synteesiä 4,4-ditiolibisbentsoehaposta mitattiin NMR-spektri, joten reagenssi oli reaktiokolviin lisättäessä liuenneena pieneen määrään DMSO-d₆:a. Tuotteen sulamispisteeksi määritettiin 186–187 °C ja tuotteesta mitattiin IR-, ¹H ja ¹³C NMR-spektrit sekä massaspektri, joka on esitetty liitteessä 8. Tuotteen absorbanssi mitattiin UV-VIS spektrofotometrillä 3.31 µM, 13.0 µM, 32.1µM ja 40.1µM vahvuisista liuoksista. Mittausten perusteella tuotteelle määritettiin molaarinen absorptiokerroin. Suoran sovitus on esitetty liitteessä 9. Tuotteen IR-spektrissä havaittiin oletetusti amidi (3340.79 cm⁻¹) sekä esterin ja amidin karbonyyliryhmät (1741.61 cm⁻¹, 1639.39 cm⁻¹).

Tuotetta yritettiin kiteyttää kloroformi-heksaani ja THF-heksaani seoksista, mutta muodostuneiden kiteiden laatu ei ollut riittävä kiderakenteen määrittämiseen. Tuotteen saanto oli 42.8 mg (35 %) valkoista sakkua.

Synteesi D2–D4

Synteesit D2–D4 suoritettiin yleisen ohjeen mukaisesti, mutta noin kaksinkertaisilla ainemäärillä. Käytetyt ainemäärät ja niitä vastaavat saannot on esitetty taulukossa 7. Yleisestä ohjeesta poiketen synteesien D2–D4 tuotteet puhdistettiin pylväskromatografialla käyttäen eluentina DCM:MeOH 95:5 seosta. Lisäksi happopesu jätettiin pois synteesissä D4, koska sen epäiltiin hajottavan tuotetta. Tuotteista mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit, jotka vastasivat synteesin D1 tuotteesta mitattuja spektrejä. Synteesien D3–D4 tuotteista määritettiin myös sulamispiste, joka vastasi synteesin D1 tuotteen sulamispistettä.

Taulukko 7. Yhteenveto synteesistä C1–C4 ja D1–D3

Synteesi	Reagenssit	Käytetty määrä (mmol)	Saanto (%)	Sulamis-piste (°C)	MS
D1	L-alaniinietyyliesteri-hydrokloridi 4,4-Ditiolibisbentsoehappo EDC HOBt	0.49 0.24 0.48 0.48	35	186–187	527.1287 [M+Na] ⁺
D2	L-alaniinietyyliesteri-hydrokloridi 4,4-Ditiolibisbentsoehappo EDC HOBt	1.04 0.52 1.04 1.04	24		
D3	L-alaniinietyyliesteri-hydrokloridi 4,4-Ditiolibisbentsoehappo EDC HOBt	0.88 0.43 0.86 0.87	27	186–187	
D4	L-alaniinietyyliesteri-hydrokloridi 4,4-Ditiolibisbentsoehappo EDC HOBt	1.17 0.58 1.16 1.17	38	186.6–187	

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3) = 504.6 \text{ g/mol}$

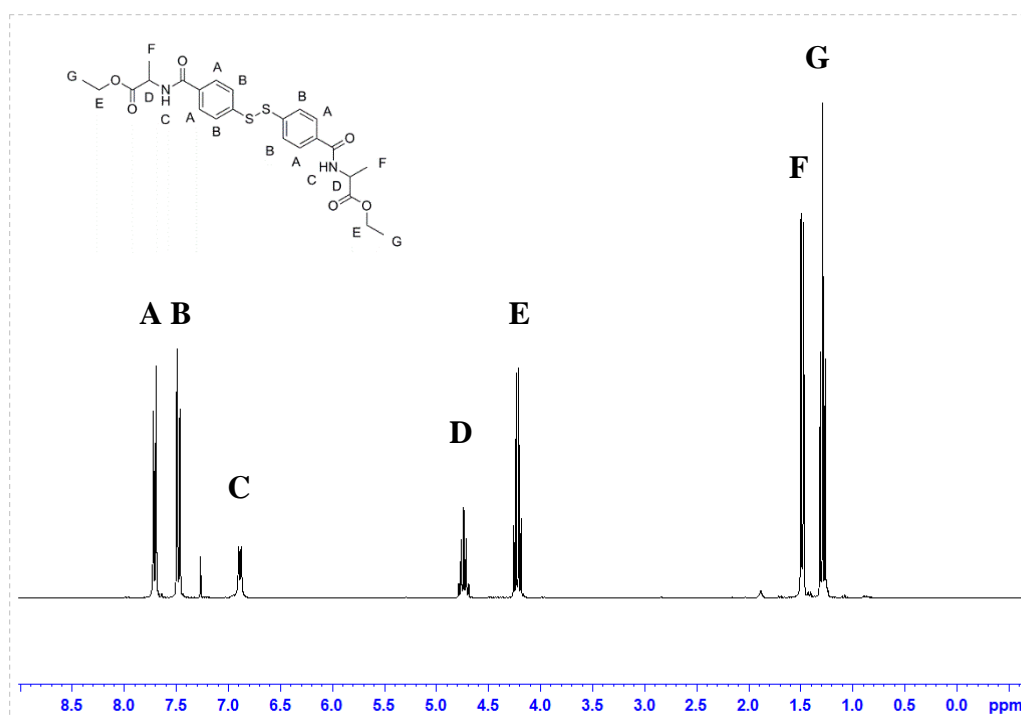
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.7$ (**A**, d, 4H, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 7.5 (**B**, d, 4H, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 6.9 (**C**, d, 2H, $J = 7.5 \text{ Hz}$), $4.8\text{--}4.7$ (**D**, quint, 2H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 4.2 (**E**, q, 4H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.5 (**F**, d, 6H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.3 (**G**, t, 6H, $J = 6.9 \text{ Hz}$) ppm

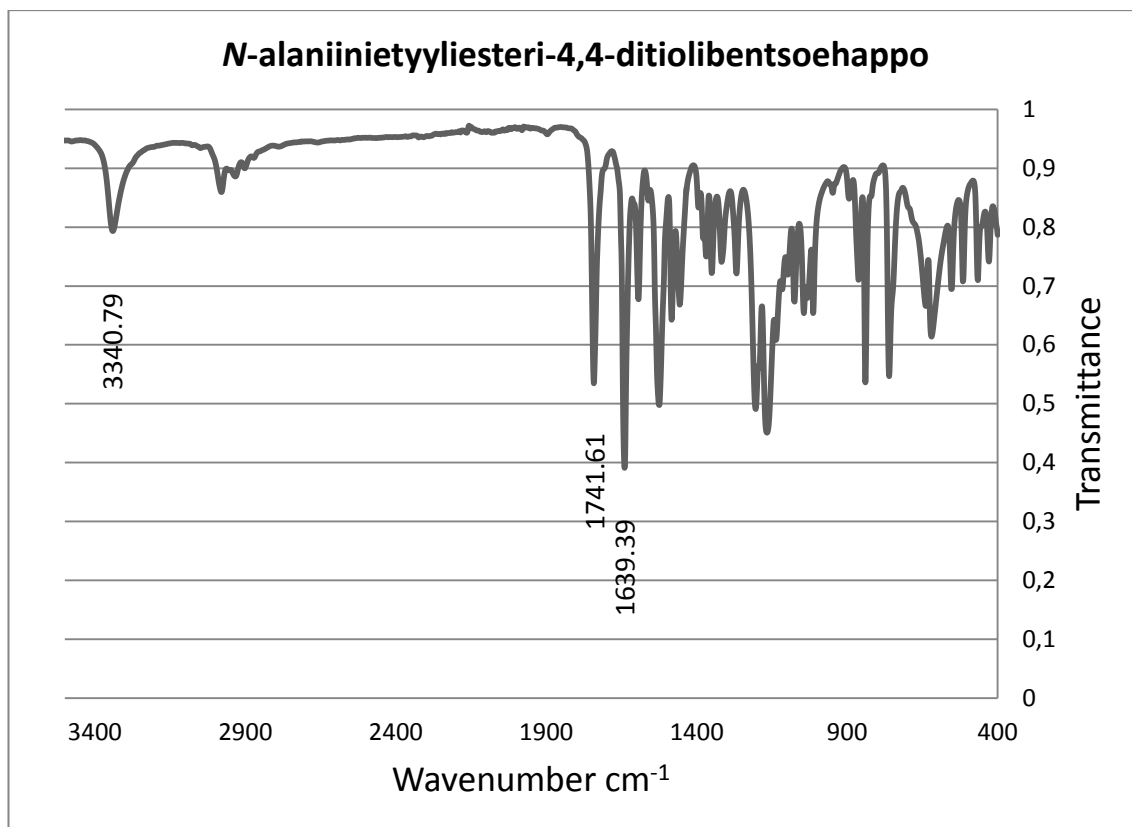
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 173.2, 165.9, 140.5, 132.6, 127.8, 126.5, 61.60, 48.51, 18.47, 14.08 \text{ ppm}$

IR: $3340.79 \text{ cm}^{-1}, 2979.62 \text{ cm}^{-1}, 1741.61 \text{ cm}^{-1}, 1639.39 \text{ cm}^{-1}, 1593.54 \text{ cm}^{-1}, 1524.54 \text{ cm}^{-1}$

MS: $m/z 527.1287 [\text{M}+\text{Na}]^+$

$\epsilon = 0.0276 \text{ l}/(\mu\text{M})$



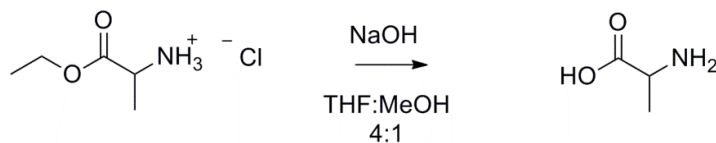


7.5 Emäskatalysoitu aminohapon α -karboksyyliiryhmän etyyliesterisuojaus- purku

Yleinen ohje¹⁰³

Lisättiin *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibentsoehapon (58.1 mg, 0.12 mmol) ja 4:1 THF:MeOH:n (20 ml) seokseen 1M LiOH:a (475 μ l, 0.48 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä noin 2.5 tuntia, jonka jälkeen seos tehtiin happamaksi (pH = 1) lisäämällä 10 % vetykloridihappoa. Reaktioseos uutettiin etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin Na₂SO₄:lla. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella.

7.5.1 L-alaniinietyyliesterinhydrokloridin etyyliesterisuojauksen purku



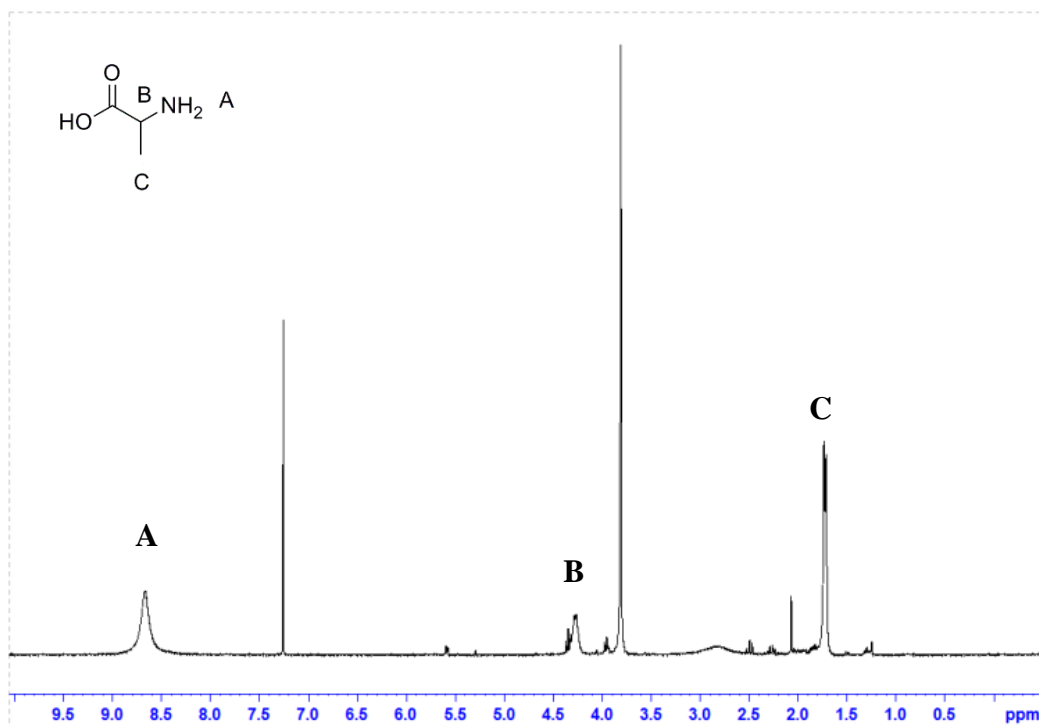
Synteesi E1

Synteesi E1 suoritettiin yleisen ohjetta mukaillen käyttäen lähtöaineena L-alaniinietyyliesterihydrokloridia (100.0 mg, 0.65 mmol) ja emäksenä LiOH:n sijaan NaOH:a (1 M, 1.3 mmol). Orgaaniseen faasiin liukeni uutossa vain hyvin pieni määrä ainetta, josta ei saatu mitattua informatiivista NMR-spektriä. Vesifaasista haihdutettiin neste pois pyöröhaihduttimella. Tämän jälkeen kolviin lisättiin 600 μ l CDCl_3 :a. Liuoksesta mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit. Spektrit osoittivat liuoksen sisältävän L-alaniinia. Koska vesifaasiin liukenivat myös sivutuotteet, synteesin saantoa ei voitu laskea luotettavasti.

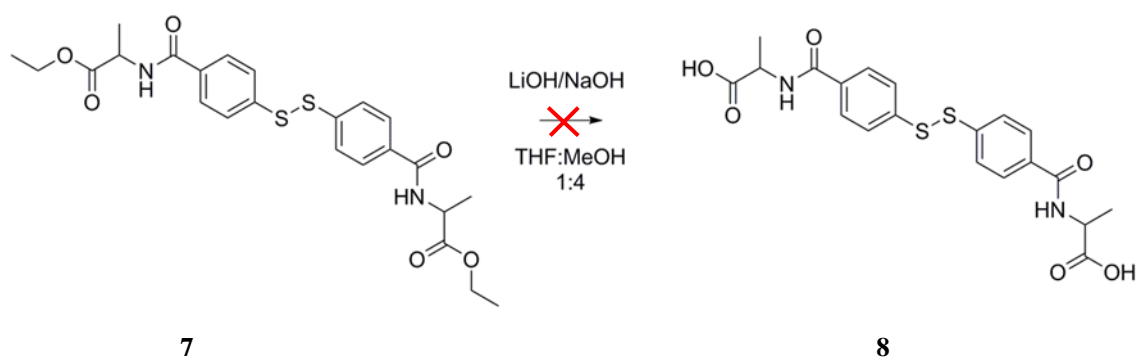
$$M(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2) = 89.1 \text{ g/mol}$$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.7$ (A, s, 2H), 4.3 (B, 1H), 1.7 (C, d, 3H, $J = 6.3$ Hz) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 170.5, 53.29, 16.05$ ppm



7.5.2 *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuojauksen purku



Synteesit E2–E3

Synteesit E2 ja E3 suoritettiin yleisen ohjeen mukaan, mutta synteesissä E2 emäksenä käytettiin LiOH:n sijasta NaOH:a (1M). Käytetyt ainemäärät on esitetty taulukossa 8. Taulukossa on myös esitetty reaktiokohtaiset sekoitusajat, jotka perustuvat reaktioiden etenemisen seurantaan ohutlevykromatografialla (DCM:MeOH 95:5). Ohutlevykromatografian perusteella lähtöaine ei kulunut reaktiossa E2 kokonaan,

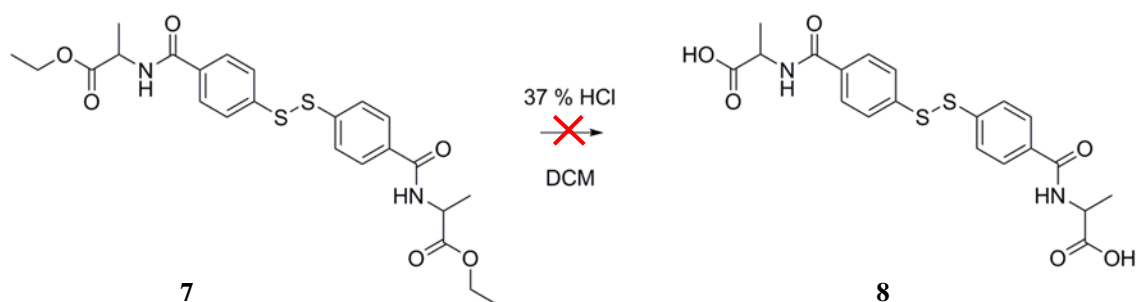
vaikka reaktioseoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä yön yli. Synteeseissä E3 ei havaittu lähtöainetta enää kahden ja puolen tunnin sekoituksen jälkeen, mutta silikalevyllä erottui himmeästi ylimääräinen tuotetäplä, jota ei kuitenkaan voitu erottaa pylväskromatografialla, koska itse päätuote ei liikkunut eluentissa. Tuotteista mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit, jotka olivat käytetystä emäksestä riippumatta samanlaiset (liite 10). Spektrit eivät kuitenkaan olleet riittävän hyvälaatuisia tuotteiden rakenteen määrittämiseen. Synteesin E2 tuotteen massaspektrissä ei havaittu *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehappoa.

Taulukko 8. Lähtöaineet, sekoitusajat ja saannot synteeseissä E2–E3

Synteesi	Reagenssi	Käytetty määrä (mmol)	Sekoitusaika
E2	7 (TGU007, TGU011)	0.12	yön yli
	NaOH	0.46	
E3	7 (TGU014)	0.12	2 h 30 min
	LiOH	0.48	

7.6 Happokatalysoitu *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuojauksen purku

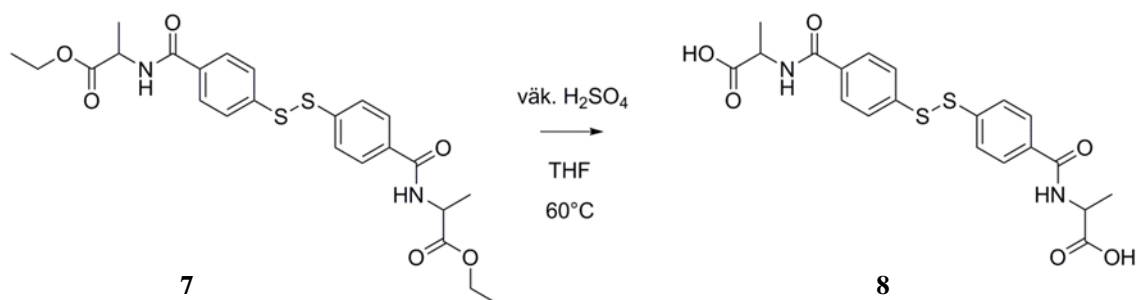
7.6.1 *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuojauksen purku vetykloridihapolla¹⁰⁴



Synteesi F1

Lisättiin 141 µl 37 % vetykloridihappoa *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (50.1 mg, 0.10 mmol) ja dikloorimetaanin (3 ml) seokseen. Seoksen annettiin sekoittua kolme tuntia huoneenlämmössä. Reaktio-etenemistä seurattiin ohutlevykromatografialla (DCM:MeOH 95:5). Ohutlevykromatografian perusteella kaikki lähtöaine ei kulunut loppuun, mutta reaktiossa vaikutti kuitenkin muodostuvan silikalevyllä liikkumatonta tuotetta. Kolmen tunnin kuluttua seokseen lisättiin dikloorimetaania, vettä ja pieni määrä vetykloridihappoa. Orgaaninen faasi pestiin kahdesti vedellä ja kuivattiin Na₂SO₄:lla. Liuotin haihdutettiin pois pyöröhaihduttimella. Tuotetta ei kuitenkaan onnistuttu eristämään uuttojen yhteydessä, vaan orgaaniseen faasiin päätyi ainoastaan lähtöainetta (27.4 mg, 55 %). Lähtöainetta menetettiin jonkin verran synteesin aikana, mutta tämä on saattanut johtua käsittelystä. Synteesin aikana on myös saattanut muodostua jonkin verran hydrolyysituotteita tai muita hajoamistuotteita, mutta näitä ei saatu uutettua dikloorimetaaniin.

7.6.2 *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon etyyliesterisuojauksen purku rikkihapolla¹⁰⁵



Synteesi F2

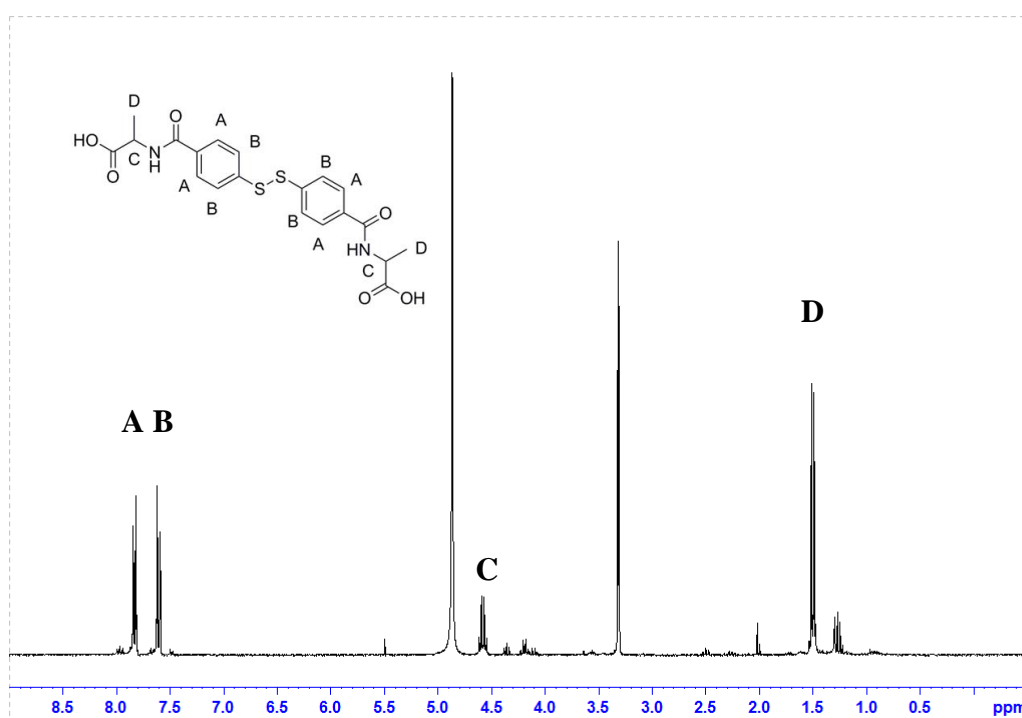
Lisättiin 0.2 ml vettä ja 6 pisaraa rikkihappoa (95–97 %) *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (62.0 mg, 0.12 mmol) ja tetrahydrofuraanin (3 ml) seokseen. Seoksen annettiin sekoittua 60 °C:ssa yön yli. Kun reaktioseos oli jäähtynyt huoneenlämpötilaan, se kaadettiin jäiseen veteen (10 ml). Seos siirrettiin erotussuppiloon ja siihen lisättiin etyyliasetaattia. Kumpaankin faasiin liukenematon sakka suodatettiin pois imusuodatuksella. Vesifaasi uutettiin etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-liuoksella ja kuivattiin Na₂SO₄:lla, jonka jälkeen liuotin haihdutettiin pois pyöröhaiduttimella. Tuotteesta mitattiin ¹H, ¹³C ja HMQC NMR-spektrit. Reaktioseoksesta ulossakanneen erän (F2b, liite 11) DMSO-d₆:ssa mitatussa ¹H NMR-spektrissä erottui sekä hydroksyyliiryhmän että amidiryhmän protoni. Kumpaakaan näistä protoneista ei havaittu etyyliasetaattiin uutetun ja MeOD:ssa mitatun tuotteen ¹H NMR-spektrissä. Tuote-erien massaspektrit antoivat kuitenkin yhdisteille saman massan, joten erot NMR spektreissä saattoivat johtua myös eri liuottimien käytöstä. Lisävarmistus tuotteen rakenteelle saatiin HMQC-spekristä. Massaspektrit ja HMQC-spektrit on esitetty liitteissä 12–15. Erän F2a sulamispisteeksi mitattiin erästä F2a 195.5–199.8 °C. Synteesin yhteissaanto oli 22.2 mg (40 %) valkoista sakkaa.

$M(C_{20}H_{20}N_2O_6S_2) = 448.5 \text{ g/mol}$

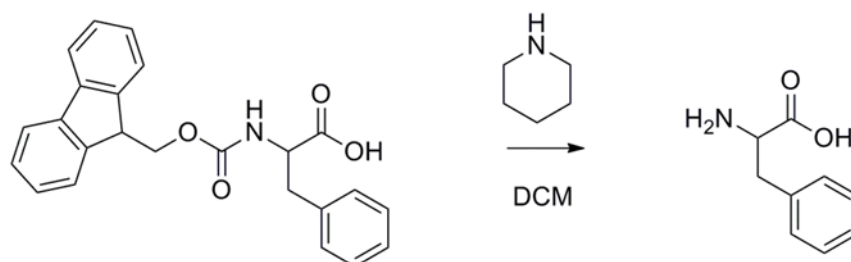
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD) $\delta = 7.9\text{--}7.8$ (**A**, d, 4H, $J = 8.7 \text{ Hz}$), 7.6 (**B**, d, 4H, $J = 8.8 \text{ Hz}$), 4.6–4.5 (**C**, q, 2H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 1.5 (**D**, d, 6H, $J = 6.0 \text{ Hz}$) ppm

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOD) $\delta = 176.2, 169.3, 142.0, 134.4, 129.6, 127.7, 50.10, 17.57$ ppm

MS: m/z 223.0311 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$



7.7 Fmoc-L-fenyyialaniinin α -aminoryhmän Fmoc-suojauksen purku



Synteesi G1¹⁰⁶

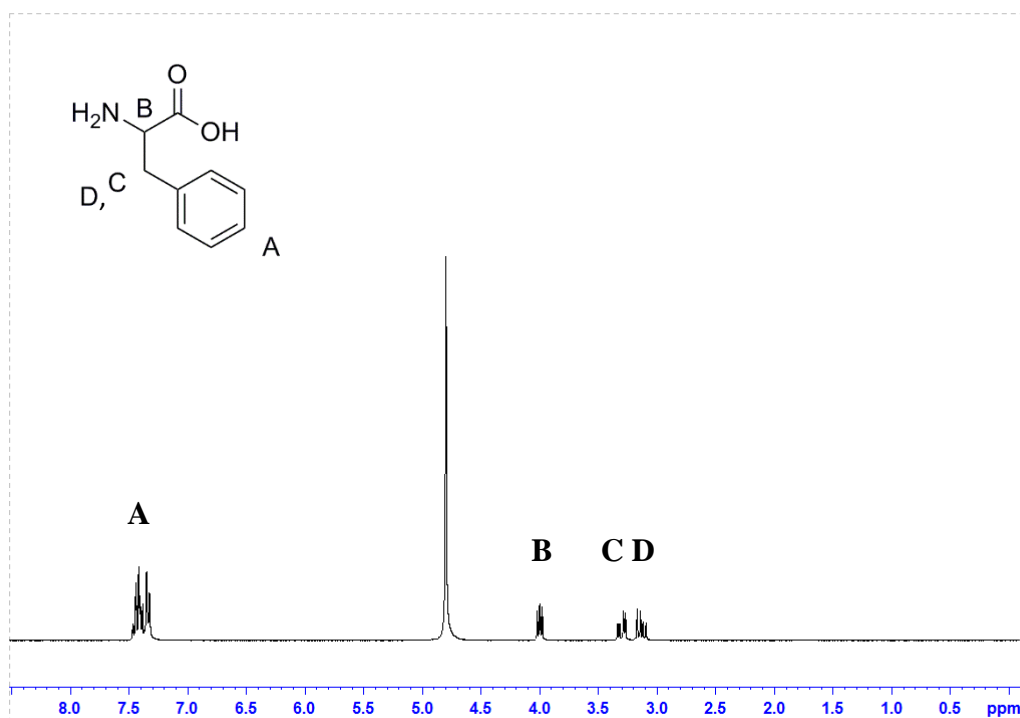
Lisättiin Fmoc-L-fenyyialaniinin (99.0 mg, 0.26 mmol) ja kuivan dikloorimetaanin (20 ml) seokseen piperidiiniä (180 μ l, 1.82 mmol) ja sekoitettiin huoneenlämmössä argonin alla viisi tuntia. Liuotin poistettiin pyöröhaihduttimella ja jäännös puhdistettiin pylväskromatografialla käyttäen eluentina 95:5 DCM:MeOH seosta. Noin kolmen tunnin sekoituksen jälkeen reaktioseokseen muodostui sakkaa. Seoksen annettiin sekoittua vielä kaksi tuntia. Muodostunut sakka suodatettiin pois imusuodatuksella. Sakasta mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit, joiden perusteella se osoittautui L-fenyyialaniiniksi. Tuotteesta mitattiin sulamispiste, joka osui vaihtelevien kirjallisuusarvojen^{107,108} välille. Tuotteen saanto oli 23.5 mg (56 %).

$M(\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2) = 165.2 \text{ g/mol}$

sp. 214 $^\circ\text{C}$ (kirjallisuusarvo: 187 $^\circ\text{C}$, 222–224 $^\circ\text{C}$ ^{107,108})

^1H NMR (300 MHz, D_2O) $\delta = 7.5\text{--}7.3$ (**A**, m, 5H, $J = 2.1 \text{ Hz}$), 4.0 (**B**, q, 1H, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 3.3 (**C**, q, 1H, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 3.2–3.1 (**D**, q, 1H) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) $\delta = 173.8, 135.0, 129.2, 129.0, 127.6, 55.92, 36.24 \text{ ppm}$



8. Yhteenveto

Työn tavoitteena oli selvittää kirjallisuudessa esitetyn amidisynteesin⁹⁴ toimivuutta osana oligopeptidipäällysteisten kultananopartikkeleiden valmistusprosessia. Synteesiohjeella valmistettiin onnistuneesti *N*-bentsoyyli-*L*-alaniinietyyliesteria (**4**), *N*-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)-*L*-fenyylialaniini-*L*-alaniinietyyliesteria (**5**) ja *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehappoa (**7**).

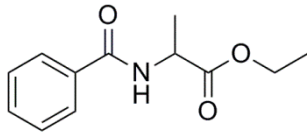
Synteesin A2 yhteydessä kaikkea tuotetta (**4**) ei onnistuttu liukoisuusongelmien takia siirtämään pylvääseen, mutta kolviin jääneestä erästä mitattu massaspektri osoitti tuotteen olleen melko puhdasta jo ennen pylväskromatografiaa. Huono liukoisuus on saattanut vaikuttaa saantoihin, sillä tuote kiteytyi helposti lasiastioiden, kuten pipettien seinämiin. Synteesin A3 tuote onnistuttiin kiteyttämään kloroformi-heksaani systeemistä ja sen kiderakenne määritettiin. Harjoituksen vuoksi tuotteen karakterisointiin käytettiin myös IR- ja UV-VIS-spektroskopiaa. Kaikista synteesien A1–A3 eristä mitattu sulamispiste oli noin 22 °C korkeampi kuin kirjallisuudessa esitetty arvo⁹⁹.

Synteesin D4 saantoa verrattuna synteesien D2–D3 saantoihin on saattanut parantaa vetykloridihappopesun poisjätto, mikäli vetykloridihappo hajottaa osan tuotteesta pesun aikana. Merkkejä vetykloridihapon aiheuttamasta molekyylin hajoamisesta ei kuitenkaan havaittu yritettäessä purkaa *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (7) etyyliesterisuojausta vetykloridihapolla. Yleisesti ottaen *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (7) alhaista saantoa voi selittää pesujen aikana muodostuvat emulsiot ja molekyylin huono liukoisuus orgaanisiin liuottimiin, mikä aiheuttaa tuotteen sakkautumista lasiastioiden, kuten pipettien, pintoihin vaikeuttaen tuotteen käsittelyä.

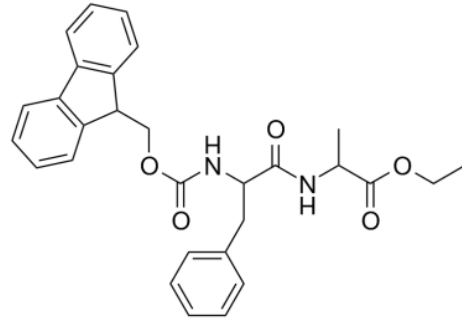
N-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (7) etyyliesterisuojausryhmä yritettiin edelleen poistaa, jotta molekyyliin olisi voitu koettaa liittää toinen aminohappo. Suojauksen purku osoittautui kuitenkin haasteelliseksi eikä toiminut emäskatalyytillä, vaikka natriumhydroksidi näytti toimivan yksittäisen aminohapon etyyliesteriryhmän poistossa. Synteesin E2 tuotteen massaspektrin perusteella lähtöaine pilkkoutui reaktiossa pienemmiksi fragmenteiksi. ¹H NMR-spektrissä puolestaan nähtiin lukuisia signaaleja alifaattisella alueella. On mahdollista, että lähtöaine on saippuoitunut ja muodostanut natriumsuoloja, jotka eivät happokäsittelystä huolimatta ole palautuneet karboksyylihapoiksi.

Synteesissä F1 havaittiin, että vetykloridihappo ei aiheuta lähtöaineelle reaktioita. Koska vetykloridihappo ei hajottanut lähtöainetta samaan tapaan kuin aiemmin testatut emäkset, päätettiin happohydrolyysia kokeilla vielä rikkihapolla ja reaktioseosta lämmittäen. Näissä hieman kovemmissa olosuhteissa etyyliesterisuojauksen purku onnistui. Työssä purettiin myös Fmoc-L-fenyylialaniinin Fmoc-suojaus onnistuneesti piperidiinillä ja valmistettiin 4,4-ditiolibisbentsoehappoa (6) osana *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon (7) synteesiä.

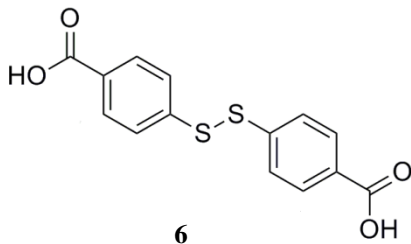
9. Valmistetut yhdisteet



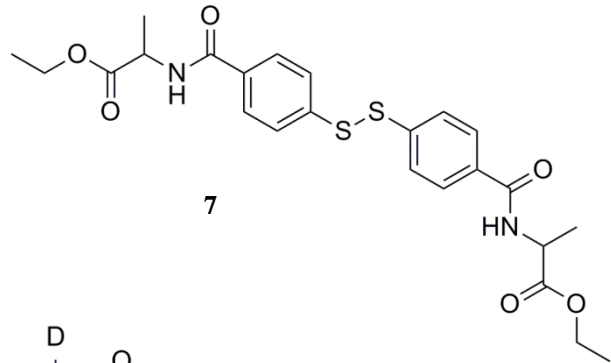
4



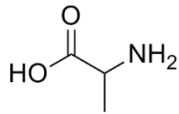
5



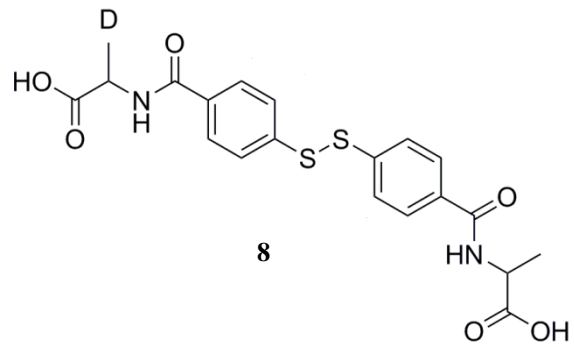
6



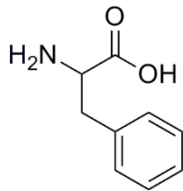
7



9



8



10

Kirjallisuusviitteet

1. M. C. Daniel ja D. Astruc, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293-346.
2. M. Hu, J. Chen, Z. Li, L. Au, G. V. Hartland, X. Li, M. Marquese ja Y. Xia, Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1084-1094.
3. J. Turkevich, P. C. Stevenson ja J. Hiller, A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
4. M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin ja R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *7*, 801-802.
5. K. M. Harkness, B. N. Turner, A. C. Agrawal, Y. Zhang, J. A. McLean ja D. E. Cliffel, Biomimetic monolayer-protected gold nanoparticles for immunorecognition, *Nanoscale* **2012**, *4*, 3843-3851.
6. K. Salorinne, T. Lahtinen, S. Malola, J. Koivisto ja H. Häkkinen, Solvation chemistry of water-soluble thiolprotected gold nanocluster Au₁₀₂ from DOSY NMR spectroscopy and DFT calculations, *Nanoscale* **2014**, *6*, 7823-7826.
7. S. W. Chen ja R. W. Murray, Electrochemical quantized capacitance charging of surface ensembles of gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B.* **1999**, *103*, 9996-10000.
8. M. J. Hostetler, A. C. Templeton ja R. W. Murray, Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules, *Langmuir* **1999**, *15*, 3782-3789.
9. A. C. Templeton, M. J. Hostetler, E. K. Warmoth, S. W. Chen, C. M. Hartshorn, V. M. Krishnamurthy, M. D. E. Forbes ja R. W. Murray, Gateway reactions to diverse, polyfunctional monolayer-protected gold clusters, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4845-4849.
10. M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C. J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Glish, M. D. Porter, N. D. Evans ja R. W. Murray, Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size, *Langmuir* **1998**, *14*, 17-30.
11. C. M. Copley, J. Chen, E. C. Cho, L. V. Wang ja Y. Xia, Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 44-56.
12. J. Zheng, C. Zhou, M. Yu ja J. Liu, Different sized luminescent gold nanoparticles, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4073-4083.

13. A. M. Jackson, J. W. Myerson ja F. Stellacci, Spontaneous assembly of subnanometre-ordered domains in the ligand shell of monolayer-protected nanoparticles, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 330-336.
14. A. Kumar, H. Ma, X. Zhang, K. Huang, S. Jin, J. Liu, T. Wei, W. Cao, G. Zou ja X. Liang, Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1180-1189.
15. M. F. Ebbesen, M. T. J. Olesen, M. C. Gjelstrup, M. M. Pakula, E. K. U. Larsen, I. M. Hansen, P. L. Hansen, J. Mollenhauer, B. M. Malle ja K. A. Howard, Tunable CD44-Specific Cellular Retargeting with Hyaluronic Acid Nanoshells, *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 1462-1474.
16. C. M. Jewell, J. Jung, P. U. Atukorale, R. P. Carney, F. Stellacci ja D. J. Irvine, Oligonucleotide Delivery by Cell-Penetrating "Striped" Nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12312-12315.
17. F. Manea, C. Bindoli, S. Fallarini, G. Lombardi, L. Polito, L. Lay, R. Bonomi, F. Mancin ja P. Scrimin, Multivalent, Saccharide-Functionalized Gold Nanoparticles as Fully Synthetic Analogs of Type A Neisseria meningitidis Antigens, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4348-4352.
18. A. C. Templeton, S. W. Chen, S. M. Gross ja R. W. Murray, Water-soluble, isolable gold clusters protected by tiopronin and coenzyme A monolayers, *Langmuir* **1999**, *15*, 66-76.
19. A. E. Gerdon, D. W. Wright ja D. E. Cliffel, Quartz crystal microbalance detection of glutathione-protected nanoclusters using antibody recognition, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 304-310.
20. S. A. Miller, L. A. Hiatt, R. G. Keil, D. W. Wright ja D. E. Cliffel, Multifunctional nanoparticles as simulants for a gravimetric immunoassay, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1021-1029.
21. A. E. Gerdon, D. W. Wright ja D. E. Cliffel, Hemagglutinin linear epitope presentation on monolayer-protected clusters elicits strong antibody binding, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3419-3424.
22. H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi ja J. V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165-1170.
23. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani ja W. C. W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662-668.
24. B. D. Chithrani ja W. C. W. Chan, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542-1550.
25. D. E. Owens ja N. A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93-102.

26. G. Zhang, Z. Yang, W. i. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang ja C. Li, Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1928-1936.
27. P. Graham, *An introduction to medicinal chemistry*, 5. Painos, Oxford University Press, UK, 2013, ss. a) 120-133, b) 583, c) 548, d) 53-55.
28. A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. L. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen ja D. L. Feldheim, Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains, *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 482-490.
29. Y. Liu, M. K. Shipton, J. Ryan, E. D. Kaufman, S. Franzen ja D. L. Feldheim, Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2221-2229.
30. A. J. Di Pasqua, R. E. Mishler, Y. Ship, J. C. Dabrowiak ja T. Asefa, Preparation of antibody-conjugated gold nanoparticles, *Mater Lett.* **2009**, *63*, 1876-1879.
31. R. Levy, Peptide-capped gold nanoparticles: Towards artificial proteins, *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 1141-1145.
32. G. Scari, F. Porta, U. Fascio, S. Avvakumova, Vladimiro Dal S., M. De Simone, M. Saviano, M. Leone, A. Del Gatto, C. Pedone ja L. Zaccaro, Gold Nanoparticles Capped by a GC-Containing Peptide Functionalized with an RGD Motif for Integrin Targeting, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 340-349.
33. R. Levy, N. T. K. Thanh, R. C. Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust ja D. G. Fernig, Rational and combinatorial design of peptide capping Ligands for gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076-10084.
34. M. G. Bellino, E. J. Calvo ja G. Gordillo, Adsorption kinetics of charged thiols on gold nanoparticles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 424-428.
35. R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis.1. Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-&.
36. R. Hong, G. Han, J. M. Fernandez, B. J. Kim, N. S. Forbes ja V. M. Rotello, Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1078-1079.
37. C. A. Simpson, K. J. Salleng, D. E. Cliffel ja D. L. Feldheim, In vivo toxicity, biodistribution, and clearance of glutathione-coated gold nanoparticles, *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2013**, *9*, 257-263.
38. C. A. Simpson, B. J. Huffman, A. E. Gerdon ja D. E. Cliffel, Unexpected Toxicity of Mono layer Protected Gold Clusters Eliminated by PEG-Thiol Place Exchange Reactions, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1608-1616.

39. C. Zhou, M. Long, Y. Qin, X. Sun ja J. Zheng, Luminescent Gold Nanoparticles with Efficient Renal Clearance, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 3168-3172.
40. M. Yu, C. Zhou, J. Liu, J. D. Hankins ja J. Zheng, Luminescent Gold Nanoparticles with pH-Dependent Membrane Adsorption, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11014-11017.
41. I. Lynch ja K. A. Dawson, Protein-nanoparticle interactions, *Nano Today* **2008**, *3*, 40-47.
42. X. Zhang, Z. Luo, J. Chen, S. Song, X. Yuan, X. Shen, H. Wang, Y. Sun, K. Gao, L. Zhang, S. Fan, D. T. Leong, M. Guo ja J. Xie, Ultrasmall Glutathione-Protected Gold Nanoclusters as Next Generation Radiotherapy Sensitizers with High Tumor Uptake and High Renal Clearance, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 8669.
43. M. Semmler-Behnke, W. G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid ja W. Brandau, Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles in Rats, *Small* **2008**, *4*, 2108-2111.
44. J. Liu, M. Yu, C. Zhou, S. Yang, X. Ning ja J. Zheng, Passive Tumor Targeting of Renal-Clearable Luminescent Gold Nanoparticles: Long Tumor Retention and Fast Normal Tissue Clearance, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4978-4981.
45. J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin ja H. M. Smilowitz, Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 977-985.
46. A. K. Iyer, G. Khaled, J. Fang ja H. Maeda, Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 812-818.
47. R. D. Vinluan, J. Liu, C. Zhou, M. Yu, S. Yang, A. Kumar, S. Sun, A. Dean, X. Sun ja J. Zheng, Glutathione-Coated Luminescent Gold Nanoparticles: A Surface Ligand for Minimizing Serum Protein Adsorption, *Acs Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 11829-11833.
48. M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent ja T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 24-46.
49. A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata ja A. F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1499-1503.
50. M. Pongsuchart, C. Danladkaew, T. Khomvarn ja A. Sereemasapun, Effect of Glutathione-Stabilized Gold Nanoparticles in 3T3 Fibroblast Cell, *International Conference on Clean and Green Energy*, Singapore, 5.1.-7.1.2012, ss. 98-102.
51. L. Y. T. Chou, K. Ming ja W. Chan, Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 233-245.

52. A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen ja D. L. Feldheim, Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4700-4701.
53. E. Vives, P. Brodin ja B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017.
54. C. M. Feldherr ja D. Akin, The Permeability of the Nuclear-Envelope in Dividing and Nondividing Cell-Cultures, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 1-8.
55. J. A. Ryan, K. W. Overton, M. E. Speight, C. M. Oldenburg, L. Loo, W. Robarge, S. Franzen ja D. L. Feldheim, Cellular uptake of gold nanoparticles passivated with BSA-SV40 large T antigen conjugates, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9150-9159.
56. S. J. Rosenthal ja D. W. Wright, *Nanobiotechnology Protocols*, 1. Painos, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005, ss. 93-95.
57. J. M. de la Fuente ja C. C. Berry, Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1176-1180.
58. S. Kumar, N. Harrison, R. Richards-Kortum ja K. Sokolov, Plasmonic nanosensors for imaging intracellular biomarkers in live cells, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1338-1343.
59. W. Zauner, A. Kichler, W. Schmidt, K. Mechtler ja E. Wagner, Glycerol and polylysine synergize in their ability to rupture vesicular membranes: A mechanism for increased transferrin-polylysine-mediated gene transfer, *Exp. Cell Res.* **1997**, *232*, 137-145.
60. P. Nativo, I. A. Prior ja M. Brust, Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles, *Acs Nano* **2008**, *2*, 1639-1644.
61. D. R. Bielenberg, C. A. Pettaway, S. Takashima ja M. Klagsbrun, Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function, *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 584-593.
62. W. Cai ja X. Chen, Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 407-428.
63. B. Kang, M. A. Mackey ja M. A. El-Sayed, Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1517.
64. L. Sun, D. Liu ja Z. Wang, Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell-targeting agents, *Langmuir* **2008**, *24*, 10293-10297.
65. S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda ja Y. Sugiura, Arginine-rich peptides - An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836-5840.

66. K. Michelsen, H. B. Yuan ja B. Schwappach, Hide and run - Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 717-722.
67. G. Zhou, Y. Liu, M. Luo, Q. Xu, X. Ji ja Z. He, Peptide-Capped Gold Nanoparticle for Colorimetric Immunoassay of Conjugated Abscisic Acid, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 5010-5015.
68. P. E. Verslues ja J. Zhu, New developments in abscisic acid perception and metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, *10*, 447-452.
69. A. Sauter, K. J. Dietz ja W. Hartung, A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling, *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 223-228.
70. R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger ja C. A. Mirkin, Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science* **1997**, *277*, 1078-1081.
71. M. Zhang, Y. Liu ja B. Ye, Colorimetric assay for parallel detection of Cd²⁺, Ni²⁺ and Co²⁺ using peptide-modified gold nanoparticles, *Analyst.* **2012**, *137*, 601-607.
72. A. Sigel, H. Sigel ja R. Sigel, *Metal Ions in Life Sciences - Nickel and its surprising impact in nature*. 2. Painos, Wiley, 2008.
73. S. Timari, C. Kallay, K. Osz, I. Sovago ja K. Varnagy, Transition metal complexes of short multihistidine peptides, *Dalton Trans* **2009**, *21*, 1962-1971.
74. Z. X. Wang, R. Levy, D. G. Fernig ja M. Brust, Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: A new approach to colorimetric kinase activity screening, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2214-2215.
75. M. Li, K. W. Wong ja S. Mann, Organization of inorganic nanoparticles using biotin-streptavidin connectors, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23-26.
76. K. H. Vousden ja X. Lu, Live or let die: The cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 594-604.
77. D. Bartczak, O. L. Muskens, T. Sanchez-Elsner, A. G. Kanaras ja T. M. Millar, Manipulation of in Vitro Angiogenesis Using Peptide-Coated Gold Nanoparticles, *Acs Nano* **2013**, *7*, 5628-5636.
78. D. Bartczak, T. Sanchez-Elsner, F. Louafi, T. M. Millar ja A. G. Kanaras, Receptor-Mediated Interactions between Colloidal Gold Nanoparticles and Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Small* **2011**, *7*, 388-394.
79. J. Folkman ja Y. Shing, Angiogenesis, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
80. T. Mustonen ja K. Alitalo, Endothelial Receptor Tyrosine Kinases Involved in Angiogenesis, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 895-898.

81. R. J. Giordano, C. D. Anobom, M. Cardo-Veila, J. Kalil, A. P. Valente, R. Pasqualini, F. Almeida ja W. Arap, Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1075-1083.
82. A. Starzec, P. Ladam, R. Vassy, S. Badache, N. Bouchemal, A. Navaza, C. Du Penhoat ja G. Y. Perret, Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex, *Peptides* **2007**, *28*, 2397-2402.
83. M. J. Kogan, N. G. Bastus, R. Amigo, D. Grillo-Bosch, E. Araya, A. Turiel, A. Labarta, E. Giralt ja VF Puentes, Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 110-115.
84. M. Stefani ja C. M. Dobson, Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678-699.
85. C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano ja B. Frangione, Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822-826.
86. N. Khlebtsov ja L. Dykman, Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647-1671.
87. E. Zhang ja A. Fu, A new strategy for specific imaging of neural cells based on peptide-conjugated gold nanoclusters, *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 2115-2124.
88. Ai Fu, Y. Wang, L. Zhan ja R. Zhou, Targeted Delivery of Proteins into the Central Nervous System Mediated by Rabies Virus Glycoprotein-Derived Peptide, *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 1562-1569.
89. X. Ding, D. Ge ja K. Yang, Colorimetric protease assay by using gold nanoparticles and oligopeptides, *Sens. Actuators. B Chem.* **2014**, *201*, 234-239.
90. P. G. Noone, Z. Q. Zhou, L. M. Silverman, P. S. Jowell, M. R. Knowles ja J. A. Cohn, Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: Relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations, *Gastroenterology* **2001**, *121*, 1310-1319.
91. C. S. Cobbett, Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 211-216.
92. J. Politi, J. Spadavecchia, M. Iodice ja L. de Stefano, Oligopeptide-heavy metal interaction monitoring by hybrid gold nanoparticle based assay, *Analyst* **2015**, *140*, 149-155.
93. P. Pengo, S. Polizzi, L. Pasquato ja P. Scrimin, Carboxylate - Imidazole cooperativity in dipeptide-functionalized gold nanoparticles with esterase-like activity, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1616-1617.

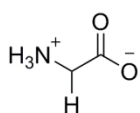
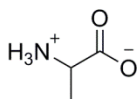
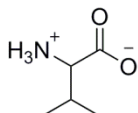
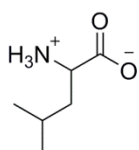
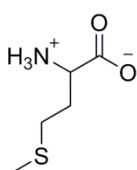
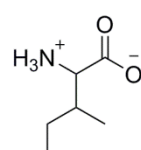
94. C. A. G. N. Montalbetti ja V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
95. J. Clayden, N. Reeves, S. Warren ja P. Wothers, *Organic chemistry*, 2. PAINOS, Oxford University Press, 2012, ss. a) 747, b) 210-211, c) 209, d) 559.
96. M. D. Taylor ja L. R. Grant, Preparation of anhydrous pyridine hydrochloride, *J. Chem. Educ.* **1955**, *32*, 39.
97. A. Isidro-Llobet, M. Alvarez ja F. Albericio, Amino Acid-Protecting Groups, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.
98. M. W. Pennington ja B. M. Dunn, *Methods in Molecular biology 35 - Peptide Synthesis Protocols*, PAINOS, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1994, ss. 22.
99. Nian-Yu Huang, Yi-Bo Nie ja Ming-Wu Ding, New Efficient Synthesis of 5-Ethoxyoxazoles and Oxazolo[3,2-c]quinazolines via Aza-Wittig Reaction, *Synlett.* **2009**, *4*, 611-614.
100. A. V. Karnik ja S. S. Kamath, Enantioselective Benzoylation of α -Amino Esters Using (*S*)-1-Benzoyl-2-(α -acetoxyethyl)benzimidazole, a Chiral Benzimidazolide, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7435-7438.
101. G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw ja K. I. Goldberg, NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
102. P. Basu, V. N. Nemykin ja R. S. Sengar, Syntheses, spectroscopy, and redox chemistry of encapsulated Oxo-Mo(V) centers: Implications for pyranopterin-containing molybdoenzymes, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7489-7501.
103. A. L. Marlow, E. Wallace, J. Seo, J. P. Lyssikatos, H. W. Yang ja J. Blake, Heterocyclic inhibitors of MEK and methods of use thereof, US20050256123 A1, 17.11, 2005.
104. B. Pelcman, K. Olofsson, M. Katkevics, V. Ozola, E. Suna, I. Kalvins ja W. Schaal, Indoles useful in the treatment of inflammation, EP1838669, 2006.
105. S. Muto ja C. Meipuru, O-substituted hydroxyaryl derivatives, WO03103656, 2003.
106. T. Taldone, D. Zatorska, P. D. Patel, H. Zong, A. Rodina, J. H. Ahn, K. Moulick, M. L. Guzman ja G. Chiosis, Design, synthesis, and evaluation of small molecule Hsp90 probes, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2603-2614.
107. E. Hoffmann ja H. Schiff-Shenhav, Some observations on the synthesis of phthaloylamino acids, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 4686-4688.

108. B. Velasco-Bejarano, J. Trujillo-Ferrara ja R. Miranda, Preparation of apoptotic inducers, 2,2-diphenyl-1,3,2-oxazaborolidin-5-ones, under alkaline conditions, *Synlett.* **2007**, *6*, 921-924.

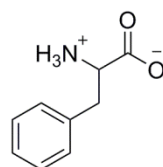
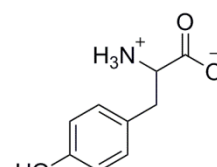
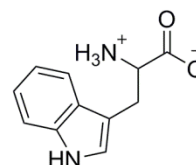
Liite 1.

IHMISELLE VÄLTTÄMÄTTÖMÄT 20 AMINOAPPOA

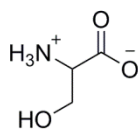
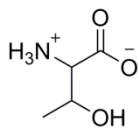
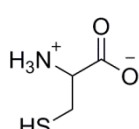
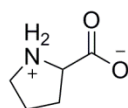
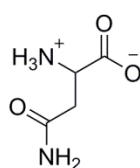
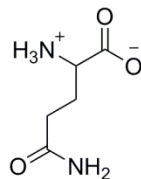
Alifaattiset sivuketjut

Glysiini
Gly, GAlaniine
Ala, AValiini
Val, VLeusiini
Leu, LMetioniini
Met, MIsoleusiini
Ile, I

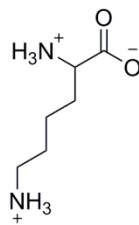
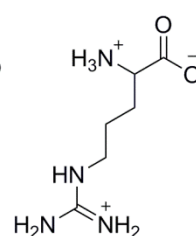
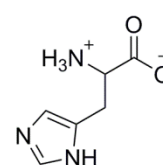
Aromaattiset sivuketjut

Fenyylialaniini
Phe, FTyrosiini
Tyr, YTryptofaani
Trp, W

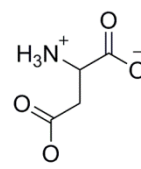
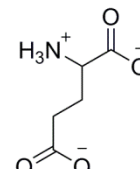
Pooliset, varuksettomat sivuketjut

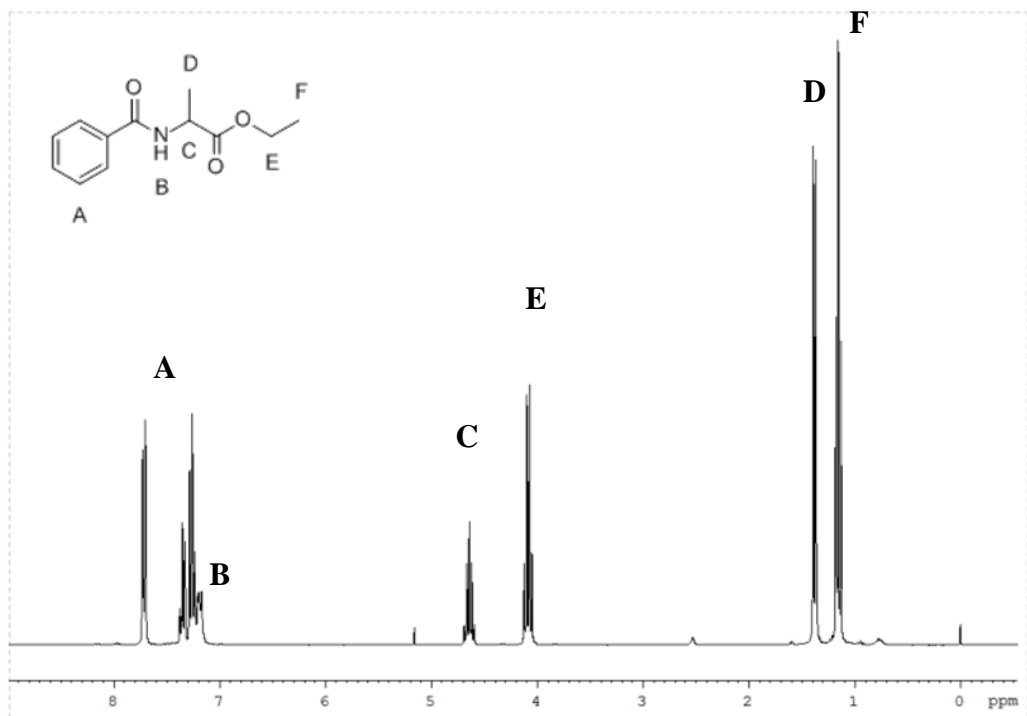
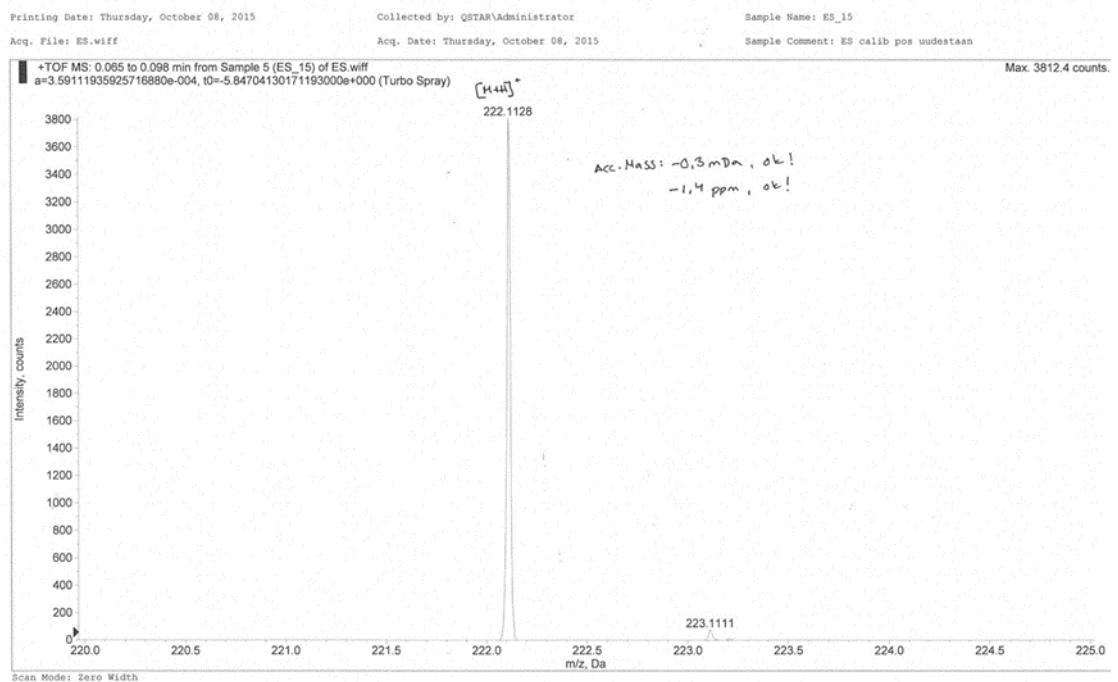
Serini
Ser, STreoniini
Thr, TKysteiini
Cys, CProliini
Pro, PAsparagiini
Asn, NGlutamiini
Gln, Q

Positiivisesti varautuneet sivuketjut

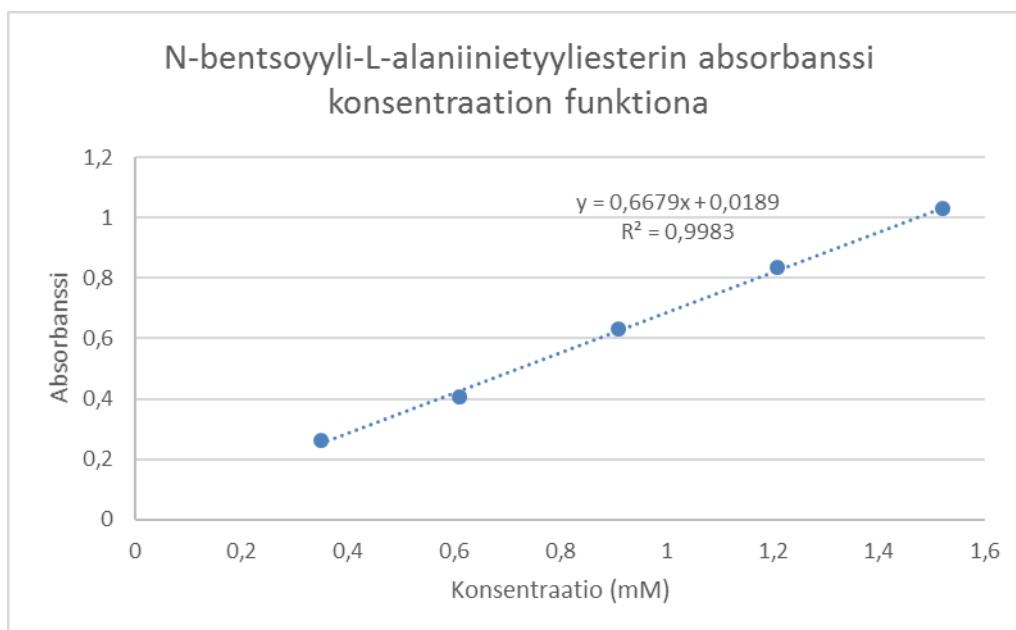
Lysiini
Lys, KArginiini
Arg, RHistidiini
His, H

Negatiivisesti varautuneet sivuketjut

Aspartaatti
Asp, DGlutamatti
Glu, E

Liite 2. *N*-bentsoyyli-L-alaniinietyyliesterin ^1H NMR-spektri (synteesi A2a)Liite 3. *N*-bentsoyyli-L-alaniinietyyliesterin massaspektri (synteesi A2b)

Liite 4. *N*-bentsoyyli-*L*-alaniinietyyliesterin absorbanssi konsentraation funktiona (synteesi A3)



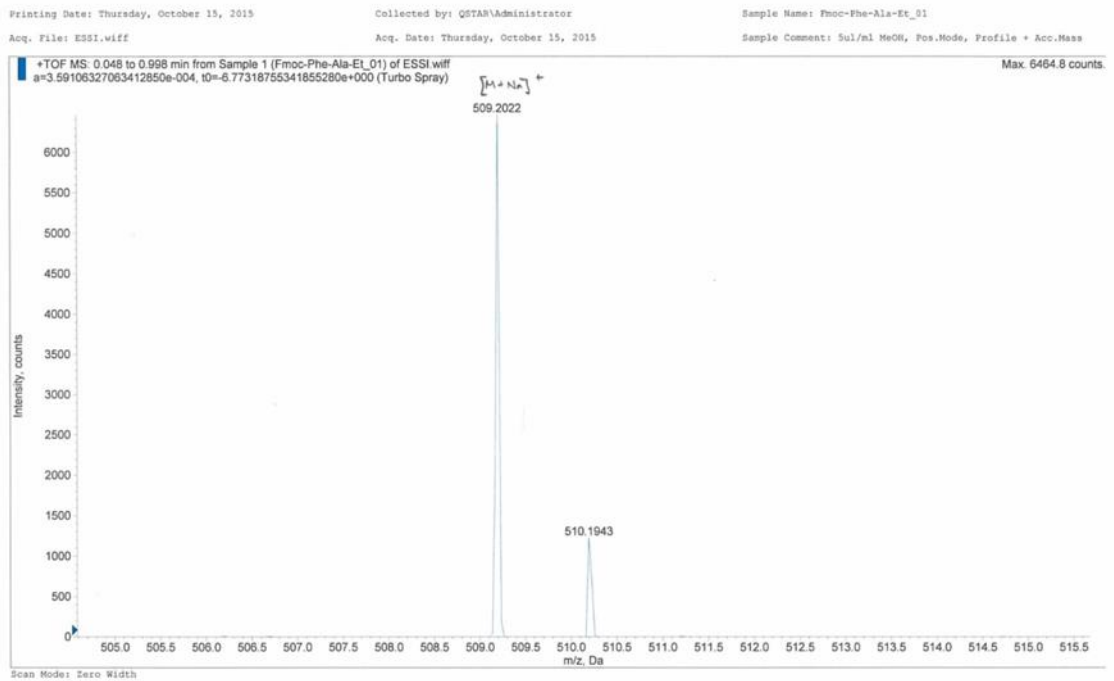
Liite 5. N-bentsoyyli-L-alaniinietyyliesterin kiderakennemittausdata

khe119

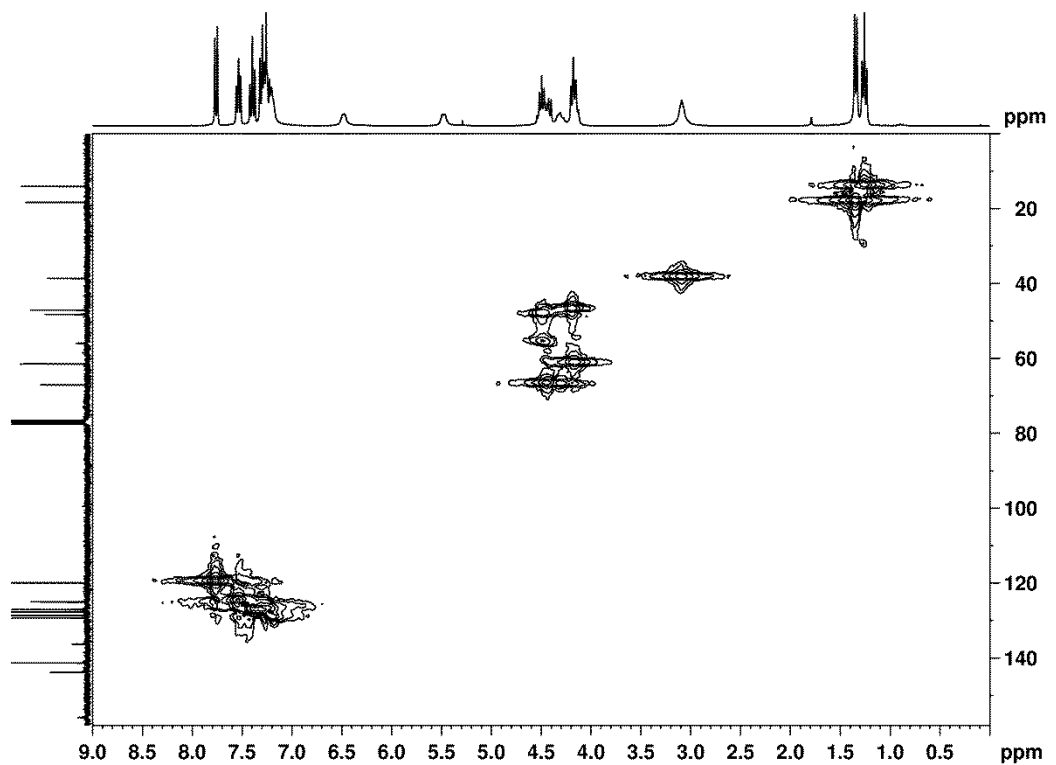
Table 1 Crystal data and structure refinement for khe119.

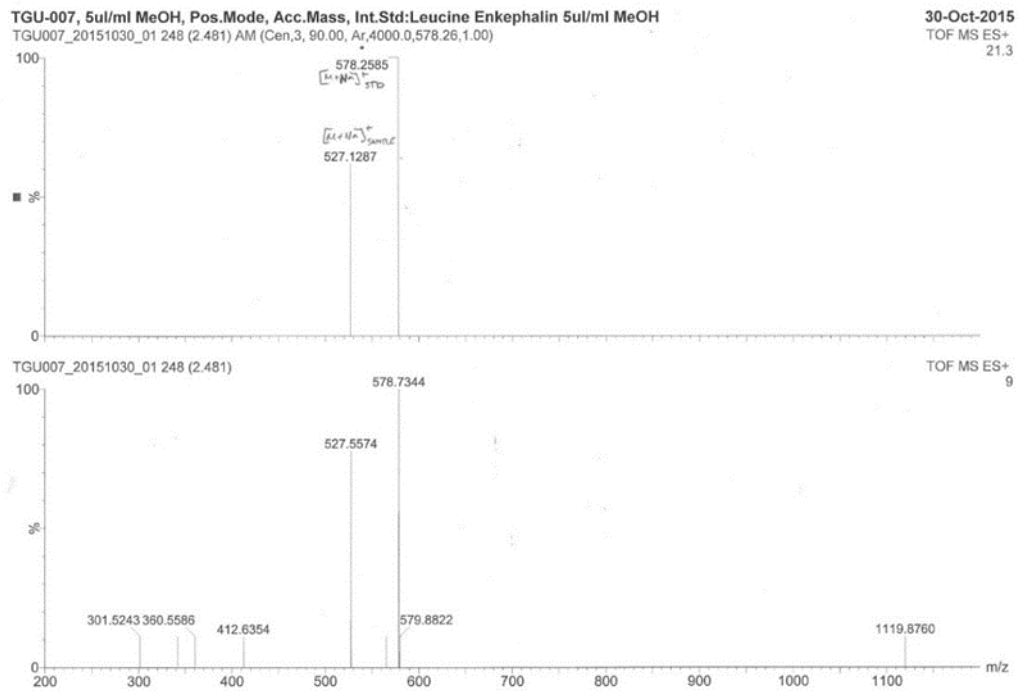
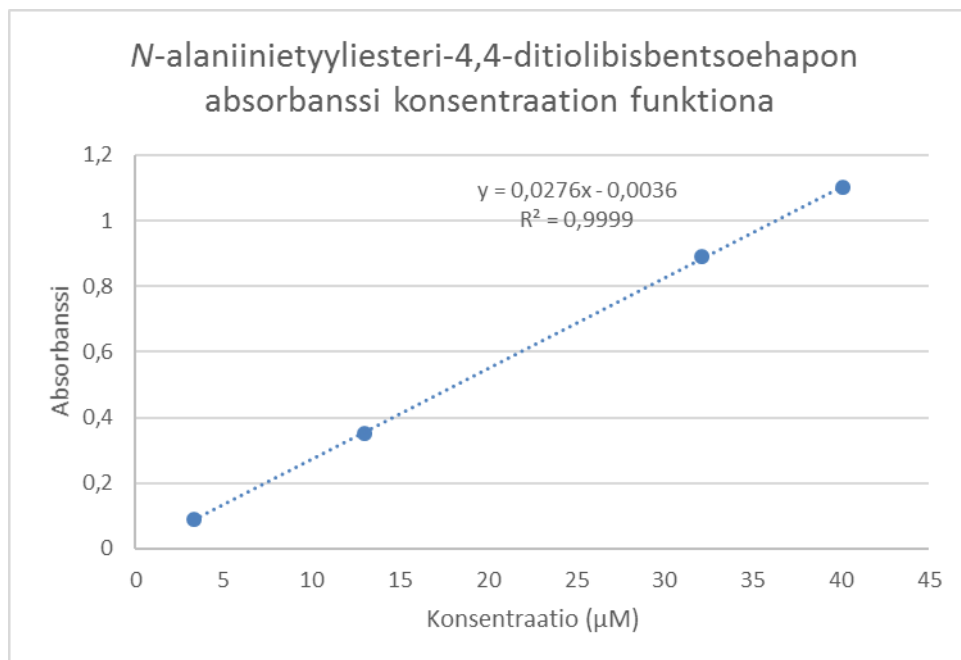
Identification code	khe119
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Formula weight	221.25
Temperature/K	173
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	5.2938(2)
b/Å	12.1920(8)
c/Å	17.7130(4)
α/°	90
β/°	90
γ/°	90
Volume/Å ³	1143.23(9)
Z	4
ρ _{calc} /cm ³	1.285
μ/mm ⁻¹	0.093
F(000)	472.0
Crystal size/mm ³	0.5 × 0.08 × 0.06
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection/°	4.6 to 57.748
Index ranges	-7 ≤ h ≤ 5, -16 ≤ k ≤ 15, -23 ≤ l ≤ 21
Reflections collected	7700
Independent reflections	2869 [R _{int} = 0.0440, R _{sigma} = 0.0644]
Data/restraints/parameters	2869/0/150
Goodness-of-fit on F ²	1.004
Final R indexes [I >= 2σ (I)]	R ₁ = 0.0465, wR ₂ = 0.0786
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0812, wR ₂ = 0.0898
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.17/-0.17
Flack parameter	0.6(9)

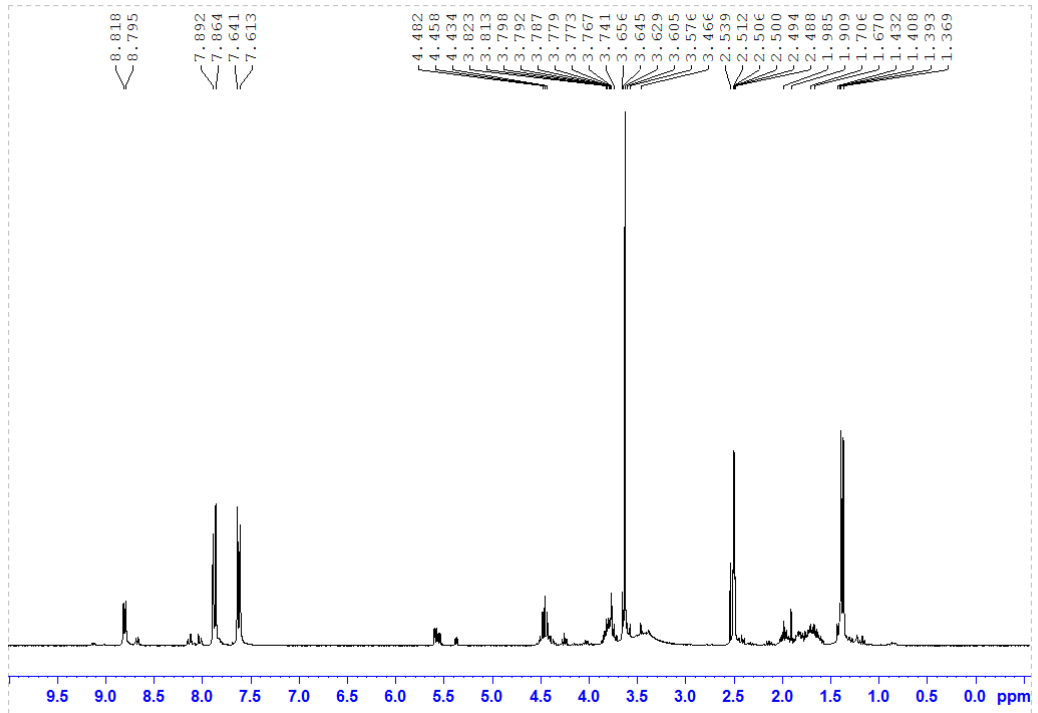
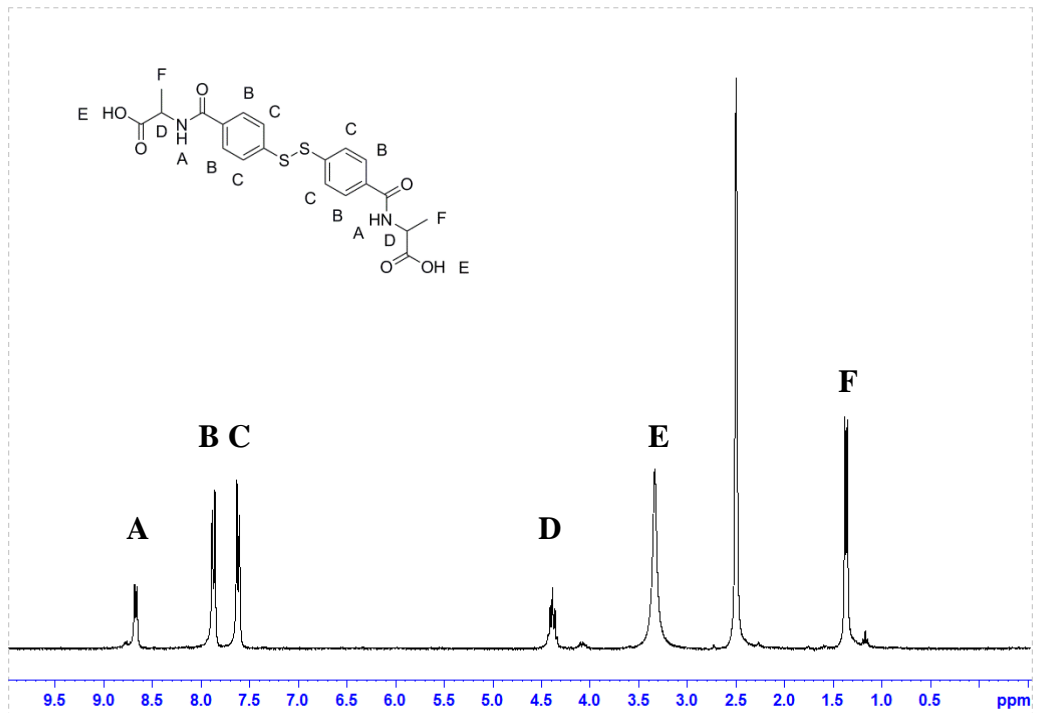
Liite 6. *N*-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)-*L*-fenyylialaniini-*L*-alaniinietyyliesterin massaspektri (synteesi B1)

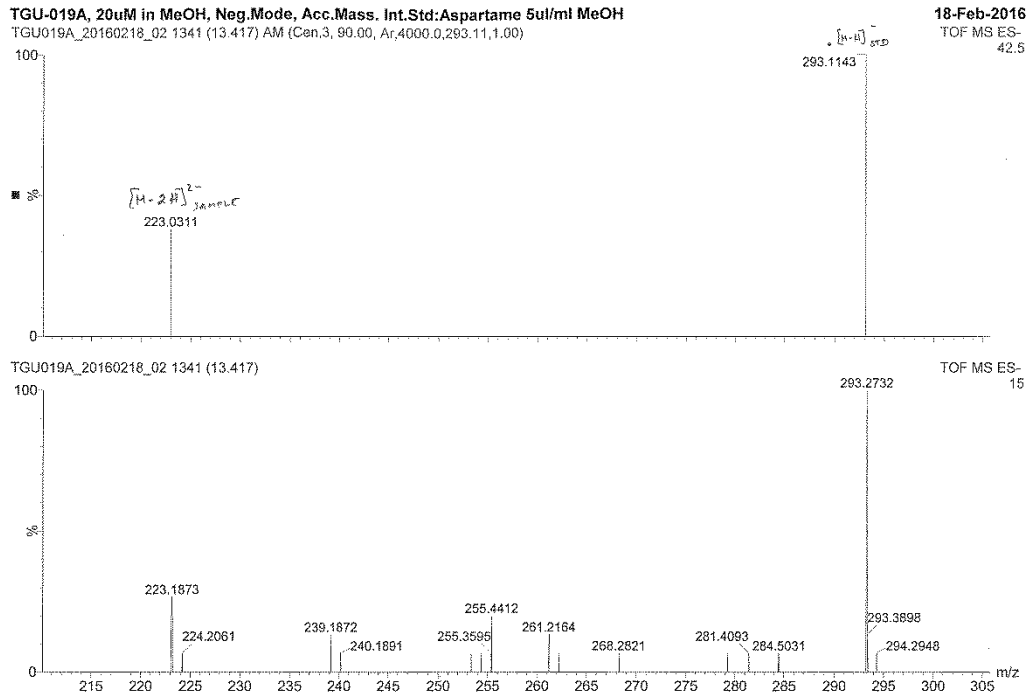
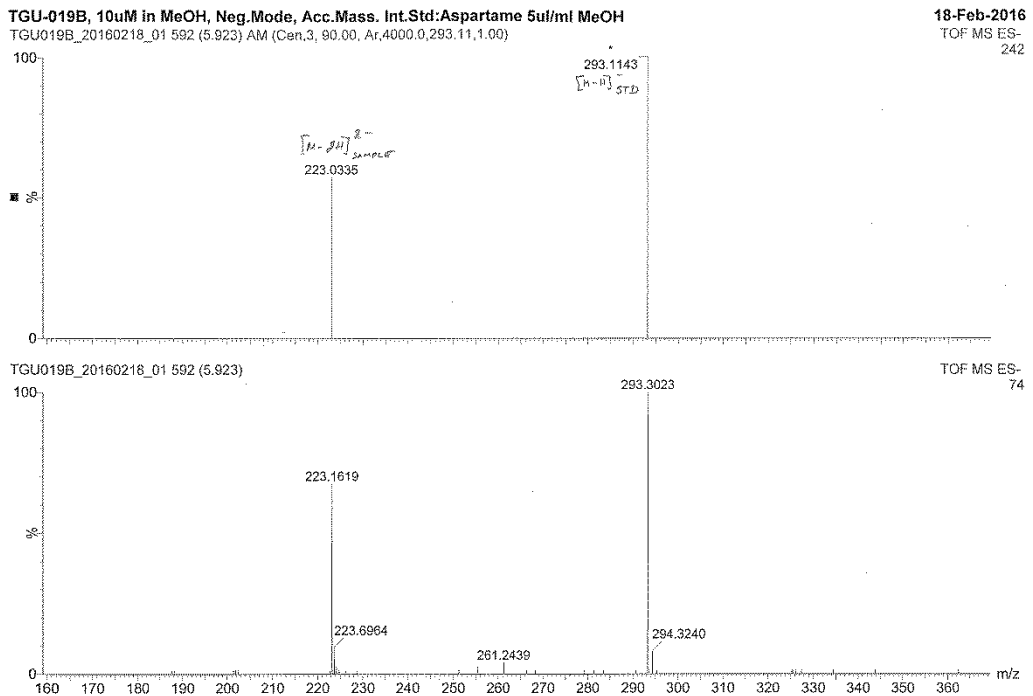


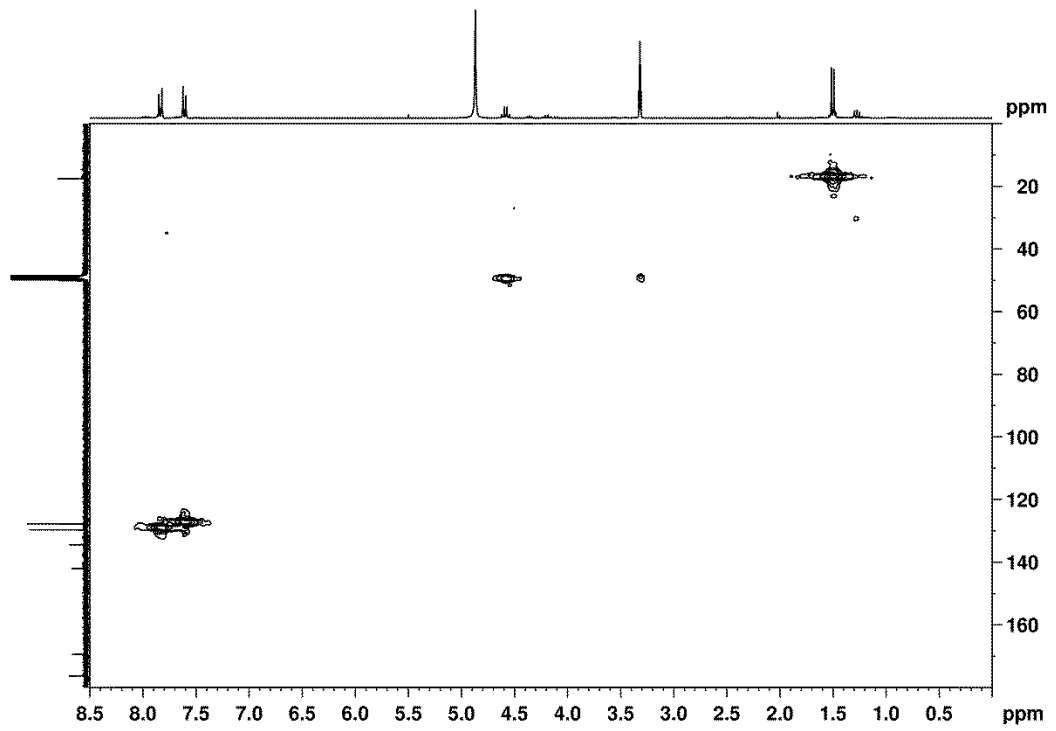
Liite 7. *N*-(9-fluorenyylimetoksykarbonyyli)-*L*-fenyylialaniini-*L*-alaniinietyyliesterin HMQC-spektri (synteesi B2)



Liite 8. *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon massaspektri (synteesi D1)Liite 9. *N*-alaniinietyyliesteri-4,4-ditiolibisbentsoehapon absorbanssi konsentraation funktiona (synteesi D1)

Liite 10. Synteesin E2 tuotteen ^1H NMR-spektriLiite 11. *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehapon ^1H NMR-spektri (synteesi F2b)

Liite 12. *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehapon massaspektri (erä F2a)Liite 13. *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehapon massaspektri (erä F2b)

Liite 14. *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehapon HMQC-spektri (erä F2a)Liite 15. *N*-alaniini-4,4-ditiolibisbentsoehapon HMQC-spektri (erä F2b)