

LÄÄKEAINEIDEN VESILIUKOISUUDEN PARANTAMINEN

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

Pro gradu -tutkielma
Meeri Käkelä
Turun yliopisto
Kemian laitos
Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia
lokakuu 2013

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

KÄKELÄ, MEERI: Lääkeaineiden vesiliukoisuuden parantaminen

Pro gradu -tutkielma, 128 s., 5 liites.

Kemia

lokakuu 2013

Monien potentiaalisten lääkeainekandidaattien vesiliukoisuus on huono. Tämä on merkittävä ongelma pyrittäessä kehittämään niistä valmiita lääkkeitä. Lääkeainekandidaattien vesiliukoisuus riippuu niiden kemiallisesta rakenteesta.

Tutkielmassa esitetään erilaisia menetelmiä kiinteiden lääkeaineiden vesiliukoisuuden parantamiseksi. Kemiallisia menetelmiä ovat suolanmuodostus, pH:n muuttaminen ja aihiolääkkeen (engl. prodrug) valmistaminen. Aihiolääke on farmakologisesti inaktiivinen yhdiste, joka metaboloituu elimistössä aktiiviseksi lääkeaineeksi. Aihiolääkettä valmistettaessa muokataan lääkeaineen kemiallista rakennetta liittämällä siihen vesiliukoisuutta lisäävä rakenne. Vesiliukoisuutta lisäävänä rakenteena voi toimia fosfaatti tai sokeri, ionisoituva orgaaninen happo tai emäs tai neutraali ryhmä. Yksi yleisimmistä menetelmistä aihiolääkkeen valmistamiseksi on käyttää aihio-osana fosforihapon estereitä tai amideja.

Fysikaalisia ja muita menetelmiä ovat esimerkiksi kiinteiden dispersioiden, nanopartikkeleiden tai nanosuspensioiden valmistaminen, kiderakenteen muokkaaminen ja syklodekstriinien hyödyntäminen inkluusiokompleksien muodostamiseksi.

Tutkielman kokeellisessa osassa tutkittiin lääkeainekandidaatti DPMBAn (*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)-4-[(2-metyylibentsyyli)amino]bentseenisulfonamidi) fosfaattimonoesterin valmistusta. DPMBAn on selektiivinen α_2 -antagonisti eli adrenoceptorien salpaaja. Kyseistä lääkeainekandidaattia voisi mahdollisesti hyödyntää sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksien hoidossa. DPMBAn ongelmana on sen huono vesiliukoisuus fysiologisessa pH:ssa, joten sen farmakologiset ominaisuudet ovat huonot.

Kokeellisen osan tavoitteena oli parantaa DPMBAn vesiliukoisuutta valmistamalla siitä aihiolääke. Aihiolääkkeen valmistus sisälsi DPMBAn synteesin kehitystä ja aihiolääkkeen valmistuksessa tarvittavien kloorimetyylifosfaattien synteesit. Aihio-osien liittämistä DPMBAnhan kokeiltiin erilaisin menetelmin. Lisäksi tutkittiin kloorimetyylifosfaattien liittämistä DPMBAn lähtöaineisiin sekä muihin samankaltaisiin primaarisiin ja sekundaarisiin amiineihin.

DPMBAn kemiallinen rakenne on haastava, eikä kokeiltuja fosfaattiaihio-osia saatu liitettyä siihen. DPMBAn rakenteessa oleva sulfonyyliryhmä, elektroneja puoleensavetävänä ryhmänä, heikentää rakenteessa olevien sekundaaristen typpiatomien nukleoofiilisyyttä. Aihiolääkkeen valmistamisen sijaan kyseeseen voisi tulla jokin fysikaalinen menetelmä DPMBAn vesiliukoisuuden parantamiseksi.

Asiasanat

aihiolääkkeet, liukeneminen, liukoisuus, lääkeaineet

Lyhenneluettelo

| | |
|---------|---|
| 2-MeTHF | 2-metyylitetrahydrofuraani |
| 4-PP | 4-pyrrolidiinopyridiini |
| Ac | asetyyli |
| ACE | angiotensiinikonvertaasientsyymi |
| Bn | bentsyyli |
| Boc | <i>tert</i> -butyylioksidikarbonyyli |
| Bu | butyyli |
| COMT | katekoli-O-metyylitransferaasi |
| DCC | <i>N,N'</i> -disykloheksyylikarbodi-imidi |
| DCM | dikloorimetaani |
| DCU | disykloheksyyliurea |
| DMAP | 4- <i>N,N</i> -dimetyyliaminopyridiini |
| DME | dimetoksietaani |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetyyliformamidi |
| DMSO | dimetyylisulfoksidi |
| DPMBA | <i>N</i> -(4,6-dimetyylipirimidin-2-yyli)-4-(2-metyyllibentsyyli-amino)bentseenisulfonamidi |
| dppe | etyleenibis(difenyylifosfiini) |
| dppf | 1,1'-bis(difenyylifosfiino)ferroseeni |
| EDC | <i>N</i> -(3-dimetyyliaminopropyli)- <i>N'</i> -etyylikarbodi-imidihydrokloridi |
| Et | etyyli |
| EtOH | etanoli |
| FTIR | Fourier muunnos infrapunaspektrometria |
| GA | gambogiinihappo |
| GC | kaasukromatografia |
| HIV | ihmisen immuunikatovirus |
| HPBCD | hydroksipropyli- β -syklodekstriini |
| HPLC | korkean erotuskyvyn nestekromatografia |
| HPMC | hydroksipropyylimetyyliselluloosa |
| iQoa | 5-isokinoyylioksidetikkahappo |

| | |
|---|--|
| MAD | maksimaalinen imeytymisannos |
| Me | metyyli |
| MeOH | metanoli |
| mPEG-SH | metoksipolyetyleeniglykolitioli |
| MS | massaspektrometria |
| <i>n</i> -Bu ₄ NHSO ₄ | tetrabutyyliammoniumvetysulfaatti |
| NaOMe | natriummetoksidi |
| NK1 | neurokiniini 1 |
| NMR | ydinmagneettinen resonanssi |
| Noa | 1-naftoksietikkahappo |
| Pd(dba) ₂ | bis(dibentsylideeniasetoni)palladium(0) |
| Pd(OAc) ₂ | palladium(II)asettaatti |
| PEG | polyetyleeniglykoli |
| PEMP | 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidiini |
| Ph | fenyyl |
| PVP | polyvinyylipyrrolidoni |
| Py | pyridiini |
| RAMEB | metyyli-β-syklodekstriini |
| TEA | trietyyliamiini |
| THC | tetrahydrokannabinoli |
| THC-HS | tetrahydrokannabinolihemisukkinaattiesteri |
| THF | tetrahydrofuraani |
| TLC | ohutkerroskromatografia |
| UV | ultravioletti |
| Z-OSu | <i>N</i> -(bentsyylioksikarbonyylioksi)sukkinimidi |

Sisällysluettelo

KIRJALLINEN OSA

| | |
|--|-----------|
| 1. JOHDANTO | 1 |
| 2. LIUKENEMINEN | 2 |
| 2.1. LIUKOISUUDEN MÄÄRITELMÄ | 2 |
| 2.2. LIUKENEMISEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ | 3 |
| 2.3. LIUKOISUUS JA PERMEABILITEETTI | 4 |
| 2.3.1. Liukoisuuden ja permeabiliteetin välinen yhteys | 4 |
| 2.3.2. Biofarmaseuttinen luokittelujärjestelmä | 6 |
| 2.4. LIUKOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KOKEELLISESTI | 6 |
| 2.4.1. Termodynaamisen liukoisuuden määrittäminen | 7 |
| 2.4.2. Kineettisen liukoisuuden määrittäminen | 7 |
| 3. ADME-OMINAISUUDET | 8 |
| 3.1. IMEYTYMINEN JA KULKEUTUMINEN SOLUKALVON LÄPI | 8 |
| 3.1.1. Imeytyminen | 8 |
| 3.1.2. Kulkeutuminen | 9 |
| 3.1.2.1. Passiivinen diffuusio | 9 |
| 3.1.2.2. Fasilitoitunut diffuusio | 9 |
| 3.1.2.3. Aktiivinen kuljetus | 10 |
| 3.1.2.4. Endosytoosi | 10 |
| 3.1.3. pH:n vaikutus | 10 |
| 3.2. JAKAUTUMINEN | 10 |
| 3.3. METABOLIA | 11 |
| 3.4. ERITYS | 12 |
| 4. VESILIUUKOISUUDEN PARANTAMINEN | 13 |
| 4.1. KEMIALLISET MENETELMÄT | 13 |
| 4.1.1. pH:n muuttaminen ja suolanmuodostus | 13 |
| 4.1.2. Aihiolääkkeet | 13 |
| 4.1.2.1. Yleistä | 13 |
| 4.1.2.2. Luokittelu | 14 |
| 4.1.2.3. Aihiolääkkeisiin liittyviä haasteita | 15 |
| 4.1.2.4. Aminohappoaihiolääkkeet | 15 |
| 4.1.2.4.1. Yleistä | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.2.4.2. Aminohappoaihiolääkkeiden haasteita | 16 |
| 4.1.2.4.3. CAM-4451:n aminohappoaihiolääkkeet | 17 |
| 4.1.2.4.4. Dapsonin aminohappoaihiolääkkeet | 18 |
| 4.1.2.4.5. Metronidatsolin aminohappoaihiolääkkeet | 19 |
| 4.1.2.5. Fosfaattiesteriaihiolääkkeet | 22 |
| 4.1.2.5.1. Yleistä | 22 |
| 4.1.2.5.2. Fosfentytoiini – fentytoiinin fosfaattiesteriaihiolääke | 23 |
| 4.1.2.5.3. Entakaponin fosfaattiesteriaihiolääke | 24 |
| 4.1.2.5.4. Fosamprenaviiri – amprenaviirin fosfaattiesteriaihiolääke | 25 |
| 4.1.2.5.5. Estramustiinifosfaatti | 27 |
| 4.1.2.6. Hemisukkinaattiesterit | 29 |
| 4.1.2.6.1. Metyyliprednisolonin ja propofolin hemisukkinaattiesterit | 29 |
| 4.1.2.7. Sulfaattiesterit | 30 |
| 4.1.2.7.1. Parasetamoln ja fentytoiinin sulfaattiesteriaihiolääkkeet | 31 |
| 4.1.2.7.2. Prednisolonin ja deksametasonin sulfaattiesteriaihiolääkkeet | 32 |
| 4.1.2.8. Muita esteraihiolääkkeitä | 34 |
| 4.1.2.8.1. Entakaponin karbamaattiesterit | 34 |
| 4.1.2.8.2. Mefenaamihapon esteraihiolääkkeet | 37 |
| 4.1.2.8.3. TAK-456:n esteraihiolääkkeet | 38 |
| 4.1.2.9. Sokerijohdannaiset | 41 |
| 4.1.2.9.1. Kamptotesiinin glukuronidijohdannainen | 41 |
| 4.1.2.9.2. Paklitakselin ahiolääkkeet – β -glukuronidin liittäminen paklitakseliin | 44 |
| 4.1.2.9.3. O-glykosyloitu taksaani | 46 |
| 4.1.2.10. Polyetyleeniglykolit | 49 |
| 4.1.2.10.1. Gambogiinihapon PEG-aihiolääkkeet | 50 |
| 4.1.2.10.2. Pemetreksenin PEG-aihiolääkkeet | 52 |
| 4.1.2.10.3. Takrolimuusin PEG-aihiolääkkeet | 54 |
| 4.1.2.11. Muita ahiolääke-esimerkkejä | 55 |
| 4.1.2.11.1. N \rightarrow O asyyliitoisiintumisreaktio | 55 |
| 4.1.2.11.2. Selekoksin ja sen johdannaisen ahiolääkkeet | 60 |
| 4.1.2.11.3. Sulindaakki | 63 |
| 4.2. FYSIKAALISIA JA MUITA MENETELMIÄ | 63 |
| 4.2.1. Kiinteät dispersiot | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1.1. MFB-1041:n vesiliukoisuuden parantaminen valmistamalla kiinteä dispersio | 64 |
| 4.2.1.2. Itrakonatsolin vesiliukoisuuden parantaminen valmistamalla kiinteä dispersio | 66 |
| 4.2.2. Nanosuspensiot | 67 |
| 4.2.2.1. Ibuprofeenin nanosuspensio | 68 |
| 4.2.3. Partikkelikoko ja nanopartikkelit | 69 |
| 4.2.4. Polymorfiset muodot | 69 |
| 4.2.5. Itse-emulgoituvat systeemit | 69 |
| 4.2.6. Syklodekstriinit | 70 |
| 4.2.6.1. Inklusiokompleksin valmistaminen ramipriilista ja β -syklodekstriinistä | 73 |
| 4.2.6.2. Tetrahydrokannabinolin aihiolääkkeen ja β -syklodekstriinin inklusiokompleksi | 75 |
| KOKEELLINEN OSA | |
| 5. TYÖN TARKOITUS | 76 |
| 6. SYNTEESIT JA NIIDEN TULOKSET | 77 |
| 6.1. SYNTEESISTRATEGIA I | 78 |
| 6.1.1. DPMBAn synteesi | 78 |
| 6.1.2. Kloorimetyylifosfaattien synteesi | 79 |
| 6.1.3. Kloorimetyylifosfaattien liittäminen DPMBAn | 80 |
| 6.2. SYNTEESISTRATEGIA II | 81 |
| 6.2.1. Johdanto | 81 |
| 6.2.2. 4-bromi-N-(4,6-dimetyylipirimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin ja 4-kloori-N-(4,6-dimetyylipirimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin synteesi | 83 |
| 6.2.3. Amiinin liittäminen aromaattiseen renkaaseen | 83 |
| 6.2.4. Fosfaattiaihio-osan liittäminen primaariseen amiiniin | 86 |
| 6.3. SYNTEESISTRATEGIA III | 88 |
| 6.4. SYNTEESISTRATEGIA IV | 90 |
| 6.5. PRIMAARISTEN JA SEKUNDAARISTEN AMIINIEN LIITTÄMINEN FOSFAATTIAIHIO-OSAAN | 90 |
| 6.5.1. Johdanto | 90 |
| 6.5.2. Fosfaattiaihio-osan liittäminen sekundaariseen amiiniin | 91 |
| 6.5.3. Fosfaattiaihio-osan liittäminen primaariseen amiiniin | 92 |
| 7. SYNTEESISTRATEGIOIDEN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS | 93 |

| | |
|---|------------|
| 7.1. MATERIAALIT JA MENETELMÄT | 93 |
| 7.1.1. Materiaalit | 93 |
| 7.1.2. Menetelmät | 93 |
| 7.1.2.1. Kromatografiset menetelmät | 93 |
| 7.1.2.2. Yhdisteiden karakterisointi | 93 |
| 7.2. DPMBBA:LLE TEHDYT LIUKOISUUSKOKEET | 94 |
| 7.2.1. DPMBBA:n liukoisuus veteen suolamuodossa | 94 |
| 7.2.2. Liukoisuuden parantajana Tween 80 | 94 |
| 7.3. SYNTEESISISTRATEGIA I | 95 |
| 7.3.1. DPMBBA | 95 |
| 7.3.2. DPMBBA:n synteesi vaihtoehtoisilla tavoilla | 96 |
| 7.3.3. Dibentsyylikloorimetyylifosfaatti | 96 |
| 7.3.4. Dibutyylidikloorimetyylifosfaatti | 97 |
| 7.3.5. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen synteesi NaH:n toimiessa emäksenä | 98 |
| 7.3.6. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen synteesi KF:n toimiessa emäksenä | 98 |
| 7.3.7. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen synteesi Ag ₂ O:n toimiessa emäksenä | 99 |
| 7.4. SYNTEESISISTRATEGIA II | 100 |
| 7.4.1. 4-bromi-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi ja 4-kloori-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi | 100 |
| 7.4.2. Ullmannin reaktio | 101 |
| 7.4.3. Palladiumreaktiot | 103 |
| 7.4.4. Reaktio fosfaattiaihio-osan ja primaarisen amiinin välillä | 105 |
| 7.5. SYNTEESISISTRATEGIA III | 108 |
| 7.5.1. Reaktio sulfametatsiin ja dibentsyylijodimetyylifosfaatin välillä | 108 |
| 7.5.2. Reaktio sulfametatsiin ja dibutyylidimetyylifosfaatin välillä | 108 |
| 7.6. SYNTEESISISTRATEGIA IV | 109 |
| 7.7. REAKTIOT FOSFAATTIAIHIO-OSAN JA AMIINIEN VÄLILLÄ | 109 |
| 7.7.1. N-(2-metyylidibentsyyli)aniliini | 109 |
| 7.7.2. Reaktio fosfaattiaihio-osan ja sekundaarisen amiinin välillä | 110 |
| 7.7.3. Reaktio fosfaattiaihio-osan ja primaarisen amiinin välillä | 110 |
| 8. TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET | 111 |
| VIITTEET | 115 |

Liite 1 – Käytetyt reagenssit ja liuottimet

KIRJALLINEN OSA

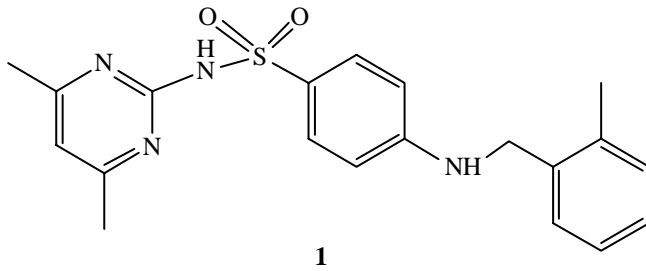
1. JOHDANTO

On arvioitu, että lääkekehityksen tuloksena saavutetuista uusista pienimolekyylisistä lääkevalmisteista (engl. new chemical entities, NCE) yli 40 % on erittäin huonosti vesiliukoisia¹. Lääkeainekandidaatin ominaisuuksista erityisesti huono solukalvon läpäisevyys (permeabiliteetti) ja huono vesiliukoisuus ovat pääsyitä siihen, ettei siitä saada kehitettyä valmista lääkettä². Nämä ominaisuudet ovat lisäksi tärkeimpiä suun kautta otettavien lääkeaineiden imeytymiseen vaikuttavia tekijöitä, sillä imeytyäkseen ruoansulatuskanavasta lääkeaineen on oltava vesiliukoisessa muodossa^{3,4}. Huonon vesiliukoisuuden ja imeytymisen seurauksena lääkeaineen biologinen hyötyosuus (engl. bioavailability) jää pieneksi tai se vaihtelee. Tällöin lääkeainetta on annettava elimistöön suurempi määrä riittävän pitoisuuden saavuttamiseksi, mikä lisää lääkehoidon kustannuksia. Huono vesiliukoisuus vaikuttaa myös ruoansulatuskanavan ulkopuoliseen annosteluun. Se voi vaikeuttaa kyseisen antotavan vaatimien liuosten valmistamista.^{5,6}

Lääkeaineen vesiliukoisuutta voidaan parantaa useilla menetelmillä. Ne voidaan luokitella kemiallisiin, fysikaalisiin ja muihin menetelmiin⁶⁻⁸. Kemiallisia menetelmiä ovat lääkeaineen kemiallisen rakenteen muokkaaminen valmistamalla siitä aihiolääke (engl. prodrug), pH:n muuttaminen ja suolanmuodostus. Fysikaalisia menetelmiä ovat partikkelikoon muuttaminen valmistamalla nanosuspensioita ja nanopartikkeleita, kiderakenteen muuttaminen ja kiinteiden dispersioiden valmistaminen. Muita menetelmiä ovat esimerkiksi apuaineiden, kuten surfaktanttien eli pintajännitystä alentavien aineiden, ja apuliuottimien (engl. cosolvents) käyttö sekä syklodekstriinien hyödyntäminen. Menetelmän valinta riippuu lääkeaineen kemiallisista, fysikaalisista ja farmakokineettisistä ominaisuuksista. Lisäksi menetelmän valintaan vaikuttavat käytettävät apuaineet sekä haluttu annoskoko ja -muoto.^{6,9-11}

Tutkielmassa tarkastellaan olomuodoltaan kiinteiden lääkeaineiden vesiliukoisuuden parantamista. Kirjallisessa osassa käsitellään vesiliukoisuutta ja siihen vaikuttavia tekijöitä sekä lääkeaineiden vaiheita elimistössä eli imeytymistä, jakautumista, metaboliaa ja erityistä (ADME-ominaisuudet). Tämän jälkeen luodaan yleiskatsaus menetelmiin, joiden avulla lääkeaineiden vesiliukoisuutta voidaan parantaa. Kirjallisuudessa kuvatut kemialliset menetelmät kuvataan kattavasti. Fysikaaliset ja muut menetelmät kuvataan

esimerkinomaisesti. Tutkielmaan liittyvän kokeellisen osan tavoitteena oli huonosti vesiliukoisen lääkeainekandidaatin (*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)-4-(2-metyylibentsyyliamino)bentseenisulfonamidi, DPMBa) (**1**) (Kuva 1) vesiliukoisuuden ja sitä kautta sen elimistöön pääsyn parantaminen liittämällä DPMBa:han aihio-osa, jolloin siitä syntyy aihiolääke.



Kuva 1. Lääkeainekandidaatin (*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)-4-(2-metyylibentsyyliamino)bentseenisulfonamidi, DPMBa) (**1**) rakenne.

DPMBa sitoutuu selektiivisesti tiettyjen α_2 -adrenoseptorien alatyyppeihin. Nämä reseptorit ovat muun muassa sileiden lihassolujen ja sydänlihassyiden reseptoreja, ja α_2 -adrenoseptorien kautta sympaattisten hermopäätteiden erittämät elimistön endogeeniset katekoliamiinit, kuten adrenaliini ja noradrenaliini, vaikuttavat lihassolujen toimintaan. DPMBa on selektiivinen α_2 -antagonisti eli adrenoseptorien salpaaja, ja sitä voisi mahdollisesti hyödyntää sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksien hoidossa. DPMBa:n ongelmana on sen huono vesiliukoisuus fysiologisessa pH:ssa (pH 7,4), joten sen farmakologiset ominaisuudet ovat huonot.^{12,13}

2. LIUKENEMINEN

2.1. LIUKOISUUDEN MÄÄRITELMÄ

Liuos (engl. solution) on nestemäinen tai kiinteä faasi, jossa eniten esiintyvä aine on liuotin ja muut aineet siihen liuotettuja aineita¹⁴. Liukoisuus (engl. solubility) ilmoittaa liuenneen aineen määrän tarkasteltavassa kylläisessä liuoksessa tietyssä lämpötilassa¹⁴. Liukoisuus voidaan ilmaista konsentraationa (mol/dm^3)¹⁵ tai jonain muuna pitoisuusyksikkönä.

Yhdisteen liukoisuus voidaan määrittellä kolmella tavalla. Puskuroimaton liukoisuus (engl. unbuffered solubility) kuvaa yleensä tilannetta vesiliuoksessa. Se tarkoittaa yhdisteen liukoisuutta kylläisessä liuoksessa siinä pH:ssa, jossa liukenemista ei enää

tapahdu. Puskuroitu liukoisuus (engl. buffered solubility) viittaa liukoisuuteen annetussa pH:ssa, ja mittaus tehdään määritellyssä pH-puskurisysteemissä. Se ei yleensä huomioi puskurisysteemissä olevien vastaionien suolanmuodostuksen vaikutuksia. Luontainen liukoisuus (engl. intrinsic solubility) tarkoittaa ionisoituvan yhdisteen neutraalin muodon liukoisuutta.¹⁶

Fligge ja Schuler luokittelevat liukoisuuden kolmeen ryhmään siten, että yhdisteen liukoisuus voi olla huono (< 20 µg/ml), liukeneminen voi tapahtua osittain (20-80 µg/ml) tai yhdiste on liukoinen (> 80 µg/ml)¹⁷. Yhdysvaltojen farmakopea (United States Pharmacopeia, USP) käyttää liukoisuudelle kuvailevia termejä (Taulukko 1)¹⁸. Sen perusteella lääkeaineelle voidaan määrittellä seitsemän liukoisuuden astetta. Liuottimen määrä ilmaistaan millilitroina ja liuenneen aineen määrä grammoina¹⁹.

Taulukko 1. Yhdysvaltojen farmakopean käyttämät kuvailevat termit liukoisuudelle.¹⁸

| Termi | Liuottimen määrä / 1 osa liuennutta ainetta | Vaihteluväli (g/ml) |
|-------------------------------|--|----------------------------|
| Erittäin liukoinen | < 1 | > 1 |
| Vapaasti liukoinen | 1-10 | 0,1-1,0 |
| Liukoinen | 10-30 | 0,03-0,1 |
| Niukasti liukoinen | 30-100 | 0,01-0,03 |
| Lievästi liukoinen | 100-1000 | 0,001-0,01 |
| Hyvin lievästi liukoinen | 1000-10 000 | 0,0001-0,001 |
| Lähes tai täysin liukenematon | ≥ 10 000 | < 0,0001 |

2.2. LIUKENEMISEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

Kiinteän molekyyli-rakenteisen yhdisteen liukenemisprosessi käsittää kolme vaihetta. Ensimmäisessä vaiheessa molekyyli poistetaan kiderakenteesta. Tämä vaatii runsaasti energiaa, koska molekyylin viereiset sidokset kiinteässä aineessa on katkaistava. Toisessa vaiheessa liuotinmolekyylit muodostavat liukenevan aineen molekyylin kannalta sopivankokoisen onkalon. Vesiliuoksessa tämä vaatii vetysidosten katkaisemista. Kolmannessa vaiheessa liukenevan aineen molekyyli on edellä muodostuneessa onkalossa. Liuotinmolekyylit ja liukenevan aineen molekyyli ovat keskenään vuorovaikutuksessa,

jolloin sidosten muodostuessa vapautuu energiaa. Vapautuvan energian määrä vaikuttaa siihen, kuinka hyvin aine liukenee sitä ympäröivään liuottimeen eli kuinka helposti liukenemistapahtuma etenee.^{7,20,21}

Lääkeainemolekyylit ovat yleensä veteen niukkaliukoisia. Mikäli liukenemista kuitenkin tapahtuu, voi liuennut molekyyli liikkua vapaasti liuoksessa, jolloin systeemin entropia kasvaa. Molekyyli voi myös törmätä kiinteään faasiin, jolloin se suurella todennäköisyydellä tarttuu siihen kiinni. Samalla muita molekyyliä voi irrota ja liueta, jolloin lopulta saavutetaan tasapaino. Todennäköisyys molekyylin irtoamiselle on kuitenkin pieni.^{22,23}

Lääkeaineen vesiliukoisuus riippuu muun muassa sen kemiallisesta rakenteesta, liuottimen ominaisuuksista ja pH:sta sekä lämpötilasta ja mahdollisesta suolanmuodostuksesta^{24,25}. Vesiliukoisuuteen vaikuttavat lääkeainemolekyylin koko^{7,26,27} ja muoto²⁸. Mitä suurempi molekyyli on kooltaan ja mitä suurempi on sen molekyylipaino, sitä huonompi on liukoisuus. Partikkelikoon kasvaessa liukenemiseen käytettävä pinta-ala pienenee. Liukenemiseen käytettävän pinta-alan pienentyessä vuorovaikutus liuottimen kanssa vähenee, mikä heikentää liukoisuutta. Kooltaan pienet, pyöreät partikkelit liukenevat paremmin kuin suuret, muodoltaan epäsäännölliset partikkelit.^{7,29}

Substituenteilla on vaikutusta molekyylin liukoisuuteen, koska ne vaikuttavat molekyylin ominaisuuksiin. Mikäli molekyyliin on substituentteja, jotka voivat muodostaa vetysidoksia vesimolekyylien kanssa, niin molekyylin vesiliukoisuus yleensä kasvaa. Monet lääkeainemolekyylit ovat heikkoja happoja tai heikkoja emäksiä, ja niiden ionisoituminen riippuu pH:sta. Vesiliuoksissa ionisoituneet muodot ovat liukoisempia kuin ionisoitumattomat muodot³⁰. Heikosti emäksiset lääkeainemolekyylit liukenevat hitaammin korkeassa pH:ssa, jolloin ionisoitumaton muoto on vallitseva. Heikosti happamat lääkeainemolekyylit liukenevat nopeammin korkeassa pH:ssa, jolloin ionisoitunut muoto on vallitseva.^{15,26}

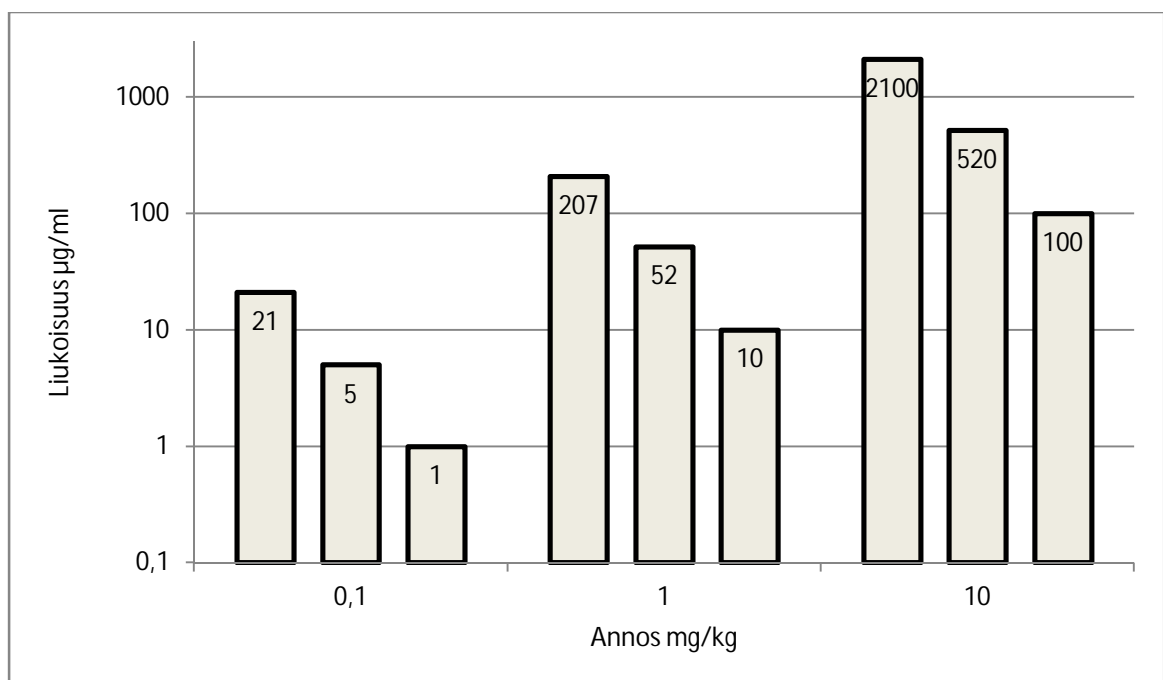
2.3. LIUKOISUUS JA PERMEABILITEETTI

2.3.1. Liukoisuuden ja permeabiliteetin välinen yhteys

Lipinski on tarkastellut lääkeaineen imeytymisen, liukoisuuden ja permeabiliteetin välistä yhteyttä^{4,31}. Kun lääkeaine annetaan elimistöön suun kautta, sen biologinen hyötyosuus riippuu sekä liukoisuudesta että permeabiliteetista⁸. Biologiseen hyötyosuuteen vaikuttavat myös lääkeaineen imeytyminen ja metabolia. Biologinen hyötyosuus tarkoittaa sitä osuutta

suun kautta annetusta lääkeaineesta, joka pääsee systeemiseen verenkiertoon ja voi sitä kautta vaikuttaa elimistössä. Se ilmaistaan usein prosentteina.³²

Permeabiliteetti rajoittaa lääkeaineen vesiliukoisuutta siten, että permeabiliteetin kasvaessa lääkeaineen liukoisuus veteen heikkenee³³. Huonon permeabiliteetin lääkeaineen on oltava liukoisempi kuin hyvän permeabiliteetin lääkeaineen, jotta sen biologinen hyötyosuus olisi riittävä. Kuva 2 havainnollistaa, millä permeabiliteetin ja liukoisuuden arvoilla (pH:ssa 6,5 tai 7,0) vältetään suun kautta annosteltavan lääkeaineen huono imeytyminen. Annokset ovat 0,1, 1 ja 10 mg/kg. Esimerkkinä tarkastellaan lääkeainetta, jonka permeabiliteetti on huono. Annos on 1 mg/kg. Kuvasta 2 nähdään, että kun lääkeaineen liukoisuus on vähintään 207 µg/ml, sen imeytyminen on riittävää. Lisäksi havaitaan, että samansuuruisella annoksella korkean permeabiliteetin lääkeaineen liukoisuudeksi riittää 10 µg/ml.⁴



Kuva 2. Lääkeaineen pienin hyväksyttävä liukoisuuden arvo (µg/ml). Pylväät havainnollistavat pienimmän mahdollisen liukoisuuden arvon huonon (vasemmanpuoleinen pylväs), keskitason (keskimmäinen pylväs) ja korkean (oikeanpuoleinen pylväs) permeabiliteetin lääkeaineelle eri annoksilla.⁴ Kuvan asteikko on logaritminen.

2.3.2. Biofarmaseuttinen luokittelujärjestelmä

Biofarmaseuttinen luokittelujärjestelmä (engl. Biopharmaceutical Classification System, BCS) luokittelee lääkeaineet niiden permeabiliteetin ja vesiliukoisuuden perusteella. Näiden lisäksi se sisältää lääkeaineen vapautumisen lääkevalmisteesta. Nämä kolme tekijää vaikuttavat lääkeaineen imeytymisen määrään ja nopeuteen ja niiden perusteella lääkeaineet voidaan luokitella neljään luokkaan. Luokittelun perusteella voidaan ennustaa lääkeaineen imeytymistä ruoansulatuskanavasta.³⁴

Luokkaan I kuuluvat lääkeaineet, joiden permeabiliteetti ja liukoisuus ovat hyviä. Tällöin liukeneminen on imeytymisen nopeutta rajoittava tekijä. Mikäli imeytyminen on hyvin nopeaa, mahalaukun tyhjeneminen on imeytymisen nopeutta rajoittava vaihe. Luokkaan II kuuluvat lääkeaineet, joilla on hyvä permeabiliteetti, mutta liukoisuus on huono. Tällöin liukeneminen on imeytymistä rajoittava tekijä. Luokan III lääkeaineiden permeabiliteetti on huono, mutta liukoisuus hyvä. Tässä permeabiliteetti on imeytymistä rajoittava tekijä. Luokan IV lääkeaineiden permeabiliteetti ja liukoisuus ovat huonoja. Tällaisten molekyylien annostelu suun kautta ei useinkaan ole tarkoituksenmukaista. Parempi vaihtoehto on muokata lääkekehitysprosessin alkuvaiheen johtolankamolekyylin (engl. lead) rakennetta, jotta lääkeaineelle saadaan tarvittavat fysikokemialliset ominaisuudet.^{9,10,35}

2.4. LIUKOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KOKEELLISESTI

Liukoisuus voidaan määrittää kokeellisesti joko termodynaamisesti tai kineettisesti. Termodynaamisen liukoisuuden määrittämiseksi kiinteä aine liuotetaan veteen ja sen annetaan saavuttaa tasapaino. Kineettistä liukoisuutta määritettäessä lähtöaineena on jo etukäteen joko veteen tai esimerkiksi dimetyylisulfoksidiin (DMSO) liuotettu yhdiste. Termodynaamista liukoisuutta pidetään yleensä yhdisteen niin sanottuna todellisena liukoisuutena. Se määritellään yhdisteen pitoisuudeksi liuoksessa silloin, kun yhdisteen liukenevan ja liukenemattoman osan välillä vallitsee tasapaino. Kineettinen liukoisuus huomioi yhdisteen saostumisen ja se määritellään pitoisuudeksi, jossa yhdisteen saostuminen alkaa. Lääkekehityksen kannalta oleellisempi näistä kahdesta on kineettinen liukoisuus. Sen avulla voidaan sopivaa mittaamenetelmää käyttäen arvioida, pysyykö DMSO:iin liuotettu yhdiste laimennoksen jälkeen liuosfaasissa.^{31,36,37}

Sekä kineettisen että termodynaamisen liukoisuuden määrittäminen perustuu kylläisen vesifaasin konsentraation mittaamiseen. Tämä tehdään mittaamalla ultraviolettia eli UV-absorptiota käyttämällä joko UV-menetelmiä tai korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). UV-menetelmät ovat yleensä nopeampia ja tehokkaampia. HPLC vaatii enemmän aikaa analyttisen konsentraation määrittämiseen, mutta samalla saadaan tietoa yhdisteiden puhtaudesta. Liukoisuus voidaan määrittää myös happo-emästitraukseen perustuvalla menetelmällä. Sen avulla saadaan yksityiskohtaista tietoa liukoisuuden pH-riippuvuudesta, mutta menetelmänä se ei ole kovin tehokas.^{38,39}

2.4.1. Termodynaamisen liukoisuuden määrittäminen

Termodynaamista liukoisuutta määritettäessä etsitään vastausta kysymykseen, missä määrin yhdiste liukenee³⁸. Termodynaamisen liukoisuuden määrittäminen on huomattavasti tarkempaa kuin kineettisen liukoisuuden määrittäminen. Termodynaamisen liukoisuuden määrittämiseksi käytetään yleensä ravistelumenetelmää (engl. shake-flask method). Siinä kiinteä yhdiste liuotetaan suoraan nesteeseen ja ravistellaan useita vuorokausia kunnes saavutetaan tasapaino. Ylimääräinen liukenematon kiinteä aine suodatetaan pois, ja liuennon aineen pitoisuus suodoksessa analysoidaan käyttämällä HPLC:iaa. Jos liukenematon kiinteä faasi on yhdisteen pysyvin muoto, määritetty liukoisuuden arvo on yhdisteen todellinen liukoisuus tasapainossa kyseisessä liuotimessa mitatussa lämpötilassa. Menetelmä vaatii suuren näytemäärän ja pitkän ajan. Sitä ei voi täysin automatisoida.^{36,40,41}

2.4.2. Kineettisen liukoisuuden määrittäminen

Kineettistä liukoisuutta määritettäessä vastataan kysymykseen, missä määrin yhdiste saostuu³⁸. Kineettisen liukoisuuden määrittämiseksi voidaan käyttää kromatografiaan tai valonsirontaan (nefelometria) perustuvaa menetelmää. Nefelometrinen määrittäminen on tehokas, mutta sen avulla ei saada tietoa mahdollisista epäpuhtauksista eikä yleensä voida havaita matalia pitoisuuksia ($< 2 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$)⁴². Virtausinjektioanalyysissä (engl. flow-injection analysis, FIA) etukäteen liuottimeen liuotetun yhdisteen annetaan asettua tasapainoon fosfaattipuskuriliuoksessa (pH 6,5) yön yli ennen analyysiä. Liukoisuus voidaan myös määrittää lisäämällä DMSO (10 µg/µl) tiipoittain fosfaattipuskuriliuokseen (pH 7,0) ja määrittämällä saostuminen. Kineettisen liukoisuuden määrittäminen on hyödyllisiä lääkekehityksen alkuvaiheissa, sillä ne soveltuvat hyvin automatisoitaviksi,

näytettä tarvitaan pieni määrä eikä menetelmiin yleensä liity näytteiden puhdistamista.^{38,39,43,44}

3. ADME-OMINAISUUDET

Farmakokinetiikka käsittelee lääkeaineiden vaiheita elimistössä eli imeytymistä, jakautumista, metaboliaa ja erityistä (ADME-ominaisuudet)⁴⁵. Näiden ominaisuuksien lisäksi vähäinen toksisuus ja hyvä selektiivisyys ovat ratkaisevia tekijöitä uusien lääkkeiden suunnittelu- ja kehitystyössä. ADME-ominaisuudet vaikuttavat esimerkiksi yhdisteen kinetiikkaan ja sitä kautta sen tehokkuuteen sekä farmakologiseen aktiivisuuteen ja näin ollen kykyyn toimia lääkkeenä.⁴⁶

Kun suun kautta otettu lääkeaine on imeytynyt, se jakautuu verenkierron mukana elimistöön ja kohdekudokseen ja kulkeutuu munuaisiin. Munuaisista se erittyy muuttumattomana virtsaan tai maksaan, josta edelleen mahdollisesti muuttumattomana sappeen. Maksassa voi myös tapahtua metaboloitumista. Muodostuneet metaboliitit voivat erittyä sellaisenaan virtsaan tai muuta kautta pois elimistöstä tai metaboloitua edelleen. Näiden farmakokineettisten prosessien aikana molekyylien on läpäistävä useita biologisia kalvoja. Niiden liikkeisiin kalvojen läpi vaikuttavat fysikokemialliset ominaisuudet, kuten koko, liukoisuus ja varaus.^{47,48}

3.1. IMEYTYMINEN JA KULKEUTUMINEN SOLUKALVON LÄPI

Lääkkeitä voidaan annostella elimistöön monella tavalla, mutta yli 90 % otetaan suun kautta⁴⁹. Syynä tähän ovat esimerkiksi antotavan yksinkertaisuus, miellyttävyys ja varmuus. Potilas välttyy kivulta, mikä lisää hoitomyöntyvyyttä. Suun kautta annosteltaessa lääkeaine kulkeutuu ruoansulatuskanavaan, jonka fysiologia vaikuttaa sen imeytymiseen ja jakautumiseen.⁵⁰

3.1.1. Imeytyminen

Imeytyäkseen lääkeaineen on liuettava ruoansulatuskanavan vesifaasiin ja lisäksi sen seinämien lipidikalvoon. Sopivan tasapainon saavuttaminen vesi- ja rasvaliukoisuuden välillä onkin välttämätöntä, jotta molekyyli voi toimia lääkeaineena. Rasvaliukoisuus riippuu lääkeaineen ionisoitumisasteesta. Mitä suurempi osuus molekyylistä on ionisoitumattomassa muodossa, sitä rasvaliukoisempi se on. Ionisoitumisaste riippuu sekä molekyylin pK_a -arvosta että elimistön nestetilojen pH-arvosta.^{10,31,51–53}

Johnson ja Swindell ovat johtaneet yhtälön lääkeaineen maksimaaliselle imeytymisannokselle (engl. maximum absorbable dose, MAD)⁵⁴. MAD ilmoitetaan milligrammoina, ja se kuvaa sitä lääkeaineen maksimimäärää, joka voi imeytyä ohutsuolesta (pH 6,5) tietyssä ajassa. Tarkasteltava aika on yleensä 4,5 tuntia. MAD-arvo ei ole täsmällinen, mutta sitä voidaan käyttää arvioitaessa lääkeaineen imeytymistä. MAD-arvoja tarkastelemalla voidaan potentiaalisten lääkeainekandidaattien joukosta löytää heikoimmin imeytyvät. Mikäli tutkimus- ja kehitysvaiheessa olevan lääkeainekandidaatin imeytymisannos havaitaan sen MAD-arvoa suuremmaksi, voidaan olettaa, ettei lääkeaine tule imeytymään täydellisesti.^{31,55}

3.1.2. Kulkeutuminen

3.1.2.1. Passiivinen diffuusio

Kulkeutuminen solukalvojen läpi voi olla joko passiivista tai kantajaan sidottu prosessi. Passiivinen diffuusio on lääkeaineiden yleisin tapa läpäistä solukalvot. Siinä molekyylit kulkeutuvat konsentraatigradientin suuntaan eli korkeammasta pitoisuudesta matalampaan. Prosessi ei kuluta energiaa. Molekyylin varaus vaikuttaa sen passiiviseen kulkeutumiseen solukalvon läpi siten, että ionisoitunut muoto diffundoituu solukalvon läpi hitaammin kuin ionisoitumaton muoto. Lisäksi molekyylin suuri koko ja taipumus muodostaa vetysidoksia hidastavat niiden kulkeutumista solukalvon läpi.^{51,56-58}

3.1.2.2. Fasilitoitunut diffuusio

Fasilitoituneessa diffuusiossa lääkeinemolekyylit kulkeutuvat solukalvon läpi sitoutumalla kalvossa oleviin kuljettajaproteiineihin. Molekyyli-proteiinikompleksin kulkeutuminen on passiivista diffuusiota nopeampaa. Fasilitoitunut diffuusio mahdollistaa hydrofiilisempien molekyylin kulkeutumisen solukalvon läpi verrattuna passiiviseen diffuusion. Fasilitoitunut diffuusio ei voi tapahtua konsentraatigradienttia vastaan. Esimerkiksi steroidit ja aminohapot siirtyvät suolen seinämän läpi fasilitoituneella diffuusiolla. Polaariset sokerimolekyylit imeytyvät hitaasti pelkän passiivisen diffuusion avulla, mutta niiden kulkeutuminen solukalvojen läpi nopeutuu merkittävästi fasilitoituneen diffuusion avulla.^{56,58}

3.1.2.3. Aktiivinen kuljetus

Aktiivinen kuljetus tarvitsee kantajaproteiinin, joka auttaa hydrofiilisiä molekyyliä läpäisemään solukalvon. Tällöin lääkeainemolekyyliä voidaan kuljettaa konsentraatiogradienttia vastaan. Tämä tapahtuu energiaa vaativan pumpun avulla. Aktiivista kuljetusta tapahtuu esimerkiksi suolen limakalvolla ja maksassa. Lisäksi sitä tarvitaan monien lääkeaineiden erittymiseen munuaisten ja sapen kautta. Kun lääkeaineen pitoisuus on korkea, kuljetuskohdat saturoituvat. Tämän jälkeen molekyylien kulkeutumisenopeus ei enää kasva. Lisäksi eri lääkeaineet, joilla on sama kantajaproteiini, voivat kilpailla keskenään. Useimmiten virtaus soluun tai kudokseen läpi on yhdistelmä diffuusiota ja kantajan vaativaa prosessia.^{47,56,58}

3.1.2.4. Endosytoosi

Endosytoosi on energiaa vaativa, yleensä hidas prosessi. Endosytoosissa solukalvo ympäröi soluun siirtyvän molekyylin, joka siirtyy soluun näin muodostuneessa rakkulassa. Endosytoosin avulla siirtyvät yleensä suurikokoiset molekyylit, kuten peptidit ja muut makromolekyylit, joiden ei ole mahdollista kulkea solukalvon läpi helposti muilla mekanismeilla.^{56,59}

3.1.3. pH:n vaikutus

Ihmisen ruoansulatuskanavassa pH vaihtelee merkittävästi. Mahalaukussa olosuhteet ovat hyvin happamat (pH 1-2) ja ohutsuolessa lähellä neutraalia (pH 5-6,5)⁶⁰⁻⁶². Tosin ohutsuolen pH vaihtelee⁶³. Tästä johtuen lääkeaineiden liukeneminen ruoansulatuskanavassa on erilaista sen eri osissa. Esimerkiksi heikon emäksen (pK_a -arvo 5,0), vesiliukoisuus ohutsuolessa on 1 µg/ml. Mahalaukun happamissa olosuhteissa vesiliukoisuus on 1-10 mg/ml. Liukoisuusero on tällöin 10000-kertainen. Jos lääkeaine on heikko happo, on sen vesiliukoisuus parempi ohutsuolen lähes neutraaleissa olosuhteissa. Mikäli mahalaukun pH nousee, voi sillä olla vaikutusta imeytymiseen. Heikkojen emästen imeytyminen voi heikentyä ja heikkojen happojen kasvaa. Lisäksi mahalaukun kohonnut pH voi parantaa sellaisten lääkeaineiden imeytymistä, jotka ovat happamissa olosuhteissa pysymättömiä.^{31,62,63}

3.2. JAKAUTUMINEN

Imeydyttyään elimistöön lääkeaine jakautuu plasmasta kudoksiin. Jakautumisen nopeuteen ja laajuuteen vaikuttavat useat tekijät. Niitä ovat esimerkiksi verenvirtaus eri elimissä,

elinten koko, lääkeainemolekyylien kyky sitoutua plasman proteiineihin ja kudokseen, solukalvojen läpäisevyys sekä lääkeaineen rasvaliukoisuus. Lääkeainemolekyylien siirtyminen kudokseen jatkuu, kunnes saavutetaan tasapaino kudokseen siirtyvien ja verenkierrassa olevien molekyylien välillä.⁴⁷

Monet happamat lääkeaineet, esimerkiksi sulfonamidit ja salisylaatit, sitoutuvat tehokkaasti plasman proteiineihin, kuten albumiiniin. Emäksiset lääkeaineet voivat sitoutua glykoproteiiniin ja lipoproteiineihin. Toisaalta ne jakautuvat yleensä tehokkaasti kudoksiin, joten niiden konsentraatio plasmassa on alhainen. Useimpien lääkeaineiden kohdalla sitoutuminen plasman proteiineihin on reversiibeli prosessi. Sitoutumisen tehokkuus on yksi lääkeainemolekyylien liikkeisiin, jakautumiseen ja eliminaatioon vaikuttavista tekijöistä.^{46,47}

3.3. METABOLIA

Monet lääkeaineet ovat rasvaliukoisia ja vain osittain ionisoituneita elimistön pH-olosuhteissa. Ne imeytyvätkin munuaisista takaisin elimistöön. Biotransformaatio on muun muassa elimistössä tapahtuva reaktio. Se tapahtuu pääasiassa maksassa, mutta myös suoliston limakalvolla, keuhkoissa ja munuaisissa. Biotransformaatioissa lääkeaineista muodostuu yleensä vesiliukoisia metaboliitteja, jotka eritetään pois elimistöstä. Biotransformaatio jaetaan kahteen vaiheeseen. Sytokromi P450 (CYP) -entsyymit katalysoivat vaiheen I reaktioita, joita ovat hapettuminen, pelkistyminen ja hydrolyysi. Siinä entsyymit muodostavat molekyyliin funktionaalisen ryhmän. Vaiheessa II elimistön endogeeniset molekyylit, esimerkiksi glutationi, glukuronidi ja sulfaatit, konjugoituvat vaiheessa I muodostuneeseen molekyyliin. Konjugoituminen voi onnistua myös suoraan ilman vaihetta I.^{47,64,65}

Suurin osa hapetusreaktioista tapahtuu maksassa. P450 -entsyymeistä CYP1A2 liittyy sekä kemikaalien että lääkeaineiden metaboliaan. Maksassa, munuaisissa, suolistossa ja hermokudoksessa oleva mitokondrioista löytyvä entsyymi monoamiinioksidaasi katalysoi monien elimistössä luonnostaan esiintyvien amiinien (kuten katekoliamiinit ja serotoniini) sekä monien lääkeaineiden oksidatiivista deaminaatiota. Pelkistyminen on hapettumista harvinaisempi reaktio. Muun muassa atso- ja nitroryhmät voivat pelkistyä.⁴⁷

Lääkeaineiden metaboliaan vaikuttavat useat tekijät. Osa niistä määräytyy geneettisesti, osa on ympäristöstä johtuvia. Sukupuolella ja iällä on todettu olevan vaikutusta metaboliaan. Monet lääkeaineet ja kemikaalit voivat nopeuttaa tai estää toisten

lääkeaineiden farmakologisia tai toksikologisia vaikutuksia muuttamalla niiden metaboliaan liittyvien entsyymien aktiivisuutta. Ekso- tai endogeeniset yhdisteet voivat myös estää metaboliaa. Yleisin tapa on kilpaileva inhibitio. Mitkä tahansa kaksi lääkeainetta, jotka metaboloituvat saman P450-entsyymin vaikutuksesta, voivat kilpailla keskenään. Lisäksi eräät lääkeaineet toimivat kilpailevina inhibiittoreina tietyille P450-entsyymeille, vaikka ne eivät metaboloitukaan kyseisen entsyymin vaikutuksesta. Tiedetyt yhdisteet voivat myös sitoutua irreversiibelisti entsyymiin reaktiivisen intermediaatin välityksellä. Tällöin entsyymin aktiivisuus voidaan palauttaa vain uusien entsyymien synteesillä.^{46,47}

3.4. ERITYS

Kun lääkeaine on metaboloitunut, se on eritettävä pois elimistöstä⁴⁶. Lääkeaineiden erittyminen munuaisten kautta ilmaistaan renaalisena puhdistumana. Se tarkoittaa sitä plasman tilavuutta, joka puhdistuu kyseisestä lääkeaineesta tietyssä aikayksikössä. Erittymistä tapahtuu pääasiassa munuaisten kautta, mutta erittyminen sappeen, sylkeen, ulosteisiin ja hikeen sekä haihtuminen hengityksen ja ihon kautta ovat mahdollisia. Erittäykseen sappeen lääkeainemolekyyleissä on yleensä oltava voimakkaasti polaarinen ryhmä. Monet sappeen erittyvät lääkeaineet ovat metaboliitteja, yleensä glukuronidikonjugaatteja.^{47,65}

Erittymiseen munuaisten kautta kuuluvat glomerulussuodatus, takaisinimeytyminen munuaistiehyestä eli tubuluksesta sekä aktiivinen erityys. Nämä tapahtuvat munuaisten toiminnallisissa yksiköissä eli nefroneissa. Osa takaisinimeytymisen vaiheista ja suodatus ovat passiivisia, erittymisessä ja takaisinimeytymisessä tarvitaan kuljetusmekanismeja. Hiussuonikeräsen eli glomeruluksen kapillaarien huokokset ovat riittävän suuria, jotta useimmat lääkeainemolekyylit pystyvät läpäisemään ne. Huokokset eivät kuitenkaan päästä lävitseen suuria molekyylejä, kuten plasman proteiineja. Tästä johtuen plasman proteiineihin sitoutuneet lääkeaineet eivät kulkeudu huokosten läpi.^{47,65}

Lääkeaineiden takaisinimeytyminen munuaistiehyestä vaihtelee heikosta lähes täydelliseen. Useimmilla lääkeaineilla takaisinimeytyminen on passiivista eli ne siirtyvät munuaistiehyestä plasmaan konsentraatiogradientin, ionisoitumisasteen ja molekyylipainon mukaan. Virtsan pH vaihtelee välillä 4,5-7 ja muutokset pH:ssa voivat vaikuttaa lääkeaineiden passiiviseen takaisinimeytymiseen ja sitä kautta siis niiden erittymiseen.

Esimerkiksi virtsan happamuus suosii heikkojen happojen, kuten salisylaattien, takaisinimeytymistä eli hidastaa niiden erittymistä.⁶⁵

Aktiivisessa erittymisessä lääkeaineet kulkeutuvat konsentraatiogradienttia vastaan verisuonista munuaistiehyen solukalvojen läpi. Aktiivinen erittyminen tapahtuu pääasiassa proksimaalisessa tubuluksessa kahdella eri mekanismilla. Toisen mekanismin avulla kulkevat orgaaniset hapot, kuten penisilliinit, ja toisen avulla orgaaniset emäkset, kuten esimerkiksi morfiini. Lääkeaineet voivat myös kulkeutua samalla kuljetusmekanismilla, jolloin ne kilpailevat keskenään.⁶⁵

4. VESILIUKOISUUDEN PARANTAMINEN

4.1. KEMIALLISET MENETELMÄT

4.1.1. pH:n muuttaminen ja suolanmuodostus

Systeemin pH:n muuttaminen saattaa olla yksinkertaisin ja tehokkain vaihtoehto orgaanisten ionisoituvien yhdisteiden vesiliukoisuuden parantamiseksi. Optimaalisissa olosuhteissa ionisoituvan lääkeaineen vesiliukoisuus voi lisääntyä eksponentiaalisesti, kun liuoksen pH:ta muutetaan. Tällaisen lääkeaineen on oltava joko heikko happo tai heikko emäs. Kun emäksisen, huonosti vesiliukoisen lääkeaineen pH:ta alennetaan lisäämällä happoa, sen liukoisuus kasvaa. Tämä johtuu siitä, että emäs muuttuu vesiliukoiseksi suolaksi. Suolanmuodostus happamasta tai emäksisestä lääkeaineesta onkin yleinen tapa vaikuttaa liukoisuuteen. Ei-ionisoituvien lääkeaineiden liukoisuutta voidaan parantaa muuttamalla dielektrisyysvakiota käyttämällä apuliuottimia.^{7,8,66}

4.1.2. Aihiolääkkeet

4.1.2.1. Yleistä

Aihiolääke on varsinaisen lääkeaineen esimuoto. Se on farmakologisesti inaktiivinen yhdiste, joka metaboloituu elimistössä aktiiviseksi lääkeaineeksi kemiallisten reaktioiden kautta. Termiä "prodrug" käytti ensimmäisenä Albert vuonna 1958⁶⁷. Lääketieteen sanastolautakunta ehdotti sanan suomalaisiksi vastineeksi ensin esiastelääke tai lääkkeen esiaste vuonna 1992. Muutamaa vuotta myöhemmin näiden tilalle esitettiin aihiolääke-sanaa.^{20,68-70}

Lääkeaineiden ja lääkeainekandidaattien huono vesiliukoisuus rajoittaa niiden terapeutista käyttöä. Huono vesiliukoisuus ja hidas jakautuminen ruoansulatuskanavassa

aiheuttavat noin 70 % potentiaalisesti aktiivisten lääkeainekandidaattien hylkäämisestä. Aihiolääkkeen valmistaminen on yksi tapa pyrkiä ratkaisemaan vesiliukoisuuteen liittyviä ongelmia. Aihiolääkkeen avulla voidaan lisäksi muun muassa parantaa lääkeaineen huonoa rasvaliukoisuutta, heikkoa imeytymistä tai vaikuttaa toksisuuteen ja vähentää sivuvaikutuksia. Elimistössä aihiolääke metaboloituu aktiiviseksi lääkeaineeksi entsyymaattisten tai kemiallisten prosessien kautta.^{47,71,72}

Aihiolääke saadaan, kun lääkeainemolekyylin liitetään rakenne kovalenttisella sidoksella. Tällöin lääkeaineen fysikokemialliset ominaisuudet muuttuvat väliaikaisesti. Rakenteen on oltava sellainen, että sen poistaminen elimistöstä on mahdollista. Liitettävä vesiliukoisuutta lisäävä rakenne voi olla neutraali ryhmä kuten polyetyleeniglykoli (PEG) tai ionisoituva orgaaninen happo tai emäs, fosfaatti tai sokeriosa, esimerkiksi glukoosi tai galaktoosi. Sokeriosa voidaan liittää lääkeaineen hydroksyyli- tai aminoryhmään linkkerin välityksellä. Aihio-osana käytetään yleisimmin fosforihapon estereitä ja amideja johtuen fosfaattiryhmän kyvystä ionisoitua.^{1,6,73-78}

Protonoituvan aminoryhmän sisältävät aihiolääkkeet ovat myös yleisiä. Ne voivat muodostaa vesiliukoisen suolan. Toisin kuin fosfaattiryhmän sisältävät aihiolääkkeet, aminoryhmän sisältävät aihiolääkkeet kykenevät imeytymään sellaisenaan ruoansulatuskanavasta. Tämä johtuu siitä, että aihiolääkettä on riittävästi vapaana emäksenä. Tässä muodossa se pystyy läpäisemään solukalvon.²⁰

4.1.2.2. Luokittelu

Aihiolääkkeet luokitellaan kantajaan sidottuihin aihiolääkkeisiin ja bioprekursoriaihiolääkkeisiin. Näistä kantajaan sidotut aihiolääkkeet voidaan jakaa edelleen bipartaattiaihiolääkkeisiin (kaksiosaiset aihiolääkkeet), tripartaattiaihiolääkkeisiin (kolmiosaiset aihiolääkkeet) ja mutuaalisiin aihiolääkkeisiin (molemmipuoliset aihiolääkkeet). Bipartaattiaihiolääkkeissä lääkeaineeseen on sitoutunut yksi kantaja, tripartaattiaihiolääkkeissä kantaja on sitoutunut lääkeaineeseen linkkerin välityksellä ja mutuaalisten aihiolääkkeiden tapauksessa kaksi lääkeainemolekyyliä on liittynyt yhteen.⁷⁹

Kantajaan sidotuissa aihiolääkkeissä aktiivinen lääkeaine on sidottu kantajaan, joka on helposti irrotettavissa siitä entsyymaattisesti. Kantajan on oltava biologisesti inaktiivinen ja elimistölle vaaraton sen jälkeen, kun se on irrotettu lääkeaineesta. Bioprekursoriaihiolääkkeet eivät sisällä kantajaa, vaan ne muokkautuvat elimistössä esimerkiksi hapettumisen tai pelkistymisen kautta uudeksi aktiiviseksi yhdisteeksi.^{72,76,79,80}

4.1.2.3. Aihiolääkkeisiin liittyviä haasteita

Erityisesti suun kautta otettavalle aihiolääkkeelle asetetaan useita vaatimuksia. Sen on oltava riittävän vesi- ja rasvaliukoinen sekä pysyvä ruoansulatuskanavan olosuhteissa. Lisäksi sen on kulkeuduttava nopeasti vaikutuskohtaansa ja metaboloitettava aktiiviseksi lääkeaineeksi sopivalla nopeudella. Aihiolääkkeen metaboloitumista on mahdollista nopeuttaa liittämällä aihio-osa lääkeaineeseen linkkerin välityksellä. Linkkerinä voi toimia esimerkiksi alkyyliryhmä. Linkkerit hajoavat spontaanisti kemiallisella hydrolyysillä aihio-osan entsymaattisen hydrolyysin jälkeen.^{79–83}

Aihio-osa sekä mahdolliset vapautuvat metaboliatuotteet eivät saisi olla toksisia, mutta tällaisia metaboliatuotteita kuitenkin muodostuu. Yksi esimerkki on formaldehydi, joka on karsinogeeni eli syöpää aiheuttava aine^{84,85}. Ihminen altistuu formaldehydille esimerkiksi ympäristön kautta. Lisäksi formaldehydiä muodostuu ihmisen elimistössä luonnostaan. Formaldehydin saanti aihiolääkkeiden kautta on vain murto-osa siitä määrästä, mitä ihminen saa esimerkiksi ympäristöstä. Ihmisen elimistö kykenee muuttamaan formaldehydin vaarattomaan muotoon tehokkaasti ja nopeasti.^{81,86}

Aihiolääkkeiden valmistaminen on haasteellista. Haasteet liittyvät aihiolääkkeiden synteisiin ja fysikokemiallisiin, farmakokineettisiin ja edellä mainittuihin toksikologisiin ominaisuuksiin. Lääkeaineeseen liitettävän aihio-osan ja linkkerin on oltava kemiallisesti riittävän pysyviä, jotta synteesi, tuotteen puhdistaminen ja karakterisointi onnistuvat.^{77,80}

4.1.2.4. Aminohappoaihiolääkkeet

4.1.2.4.1. Yleistä

Pyrittäessä parantamaan lääkeaineen vesiliukoisuutta voidaan molekyyliin liittää joko luonnollinen aminohappo tai sen johdannainen, joka toimii aihio-osana. Aminohapoissa on vesiliukoisuutta lisäävänä ionisoituvana rakenteena negatiivisesti varautunut karboksyyliiryhmä tai positiivisesti varautunut aminoryhmä. Aminohapon α -amino- tai α -karboksyyliiryhmä voidaan liittää molekyylin amino-, hydroksyyli- tai karboksyyliiryhmään. Useimmat näistä aihiolääkkeistä ovat rakenteeltaan estereitä tai amideja. Niiden lisäksi aminohappoaihiolääkkeet voivat olla tioestereitä, karbonaatteja, karbamaatteja, eettereitä tai tioeettereitä.^{78,87,88}

Aminohappo voi liittyä lääkeaineeseen myös sivuketjunsä kautta. Tästä johtuen lääkeaineeseen liitettäviä funktionaalisia ryhmiä on käytössä useita. Aminohappojen

käyttämällä aihio-osana onkin etuja. Käytössä on laaja valikoima, johon kuuluvat luonnolliset ja luonnollisen kaltaiset sekä synteettisesti valmistetut aminohapot. Elimistön omat entsyymit, kuten esteraasit ja amidaasit, muuttavat kyseiset aihiolääkkeet elimistössä aktiiviseksi lääkeaineeksi. Aminohappoja on kaupallisesti saatavilla ja niitä pidetään yleisesti ottaen turvallisina.⁸⁷⁻⁸⁹

Aminohappoaihiolääkkeissä tyypillinen α -aminoryhmän pK_a -arvo on 6,8-7,9 ja α -karboksyyliiryhmän pK_a -arvo on 3,5-4,3. Näin ollen aihiolääkkeen liukoisuus ja myös imeytyminen ovat pH-riippuvaisia. Fysiologisessa pH:ssa α -aminohapot ovat kahtaisionimuodossa eli ulkoisesti varauksettomia. Koska aihiolääkkeitä valmistettaessa varsinaiseen lääkeainemolekyylisiin liittyy yleensä aminohapon α -amino- tai α -karboksyyliiryhmä, ei kahtaisionia muodostu. Poikkeuksena ovat kuitenkin sellaiset α -aminohapot, joilla on sivuketjussaan sopiva funktionaalinen ryhmä aihiolääkkeen muodostamiseksi. Tällaisia ovat esimerkiksi kysteiniin SH-ryhmä, seriiniin, treoniiniin ja tyrosiiniin OH-ryhmä, lysiiniin NH_2 -ryhmä sekä asparagiini- ja glutamiinihapon COOH-ryhmä.⁸⁷

Sivuketjun polaarinen tai pooliton luonne vaikuttaa α -aminohappojen vesiliukoisuuteen. Kun α -aminohapoissa on varaukseton, mutta polaarinen ryhmä sivuketjussa, ovat ne yleensä vesiliukoisempia kuin vastaavat α -aminohapot, joilla on sivuketjussaan pooliton ryhmä. Vesiliukoisuus alenee hiilivetyketjun pidentyessä.⁸⁸

Aihiolääkkeessä oleva amidisidos on esterisidosta pysyvämpi kemiallista hydrolyysiä vastaan. Amidisidoksessa elektronit ovat delokalisoituneet, mikä vahvistaa amidisidosta verrattuna esterisidokseen. Lisäksi amidisidos on vähemmän polarisoitunut kuin esterisidos johtuen tyypin pienemmästä elektronegatiivisuudesta happeen verrattuna. Aihio-osana toimiva aminohappo vaikuttaa merkittävästi muodostuneen aihiolääkkeen kemialliseen pysyvyyteen. Esteri- tai amidisidoksen sisältävä aihiolääke, jossa on aihio-osana lyhytketjuinen alifaattinen aminohappo (kuten glysiini tai alaniini), hydrolysoituu vesiliuoksessa nopeammin kuin aihiolääke, jossa aihio-osana on haarautunut alifaattinen aminohappo (kuten valiini tai isoleusiini) tai aromaattinen aminohappo (fenyylialaniini).^{87,90,91}

4.1.2.4.2. Aminohappoaihiolääkkeiden haasteita

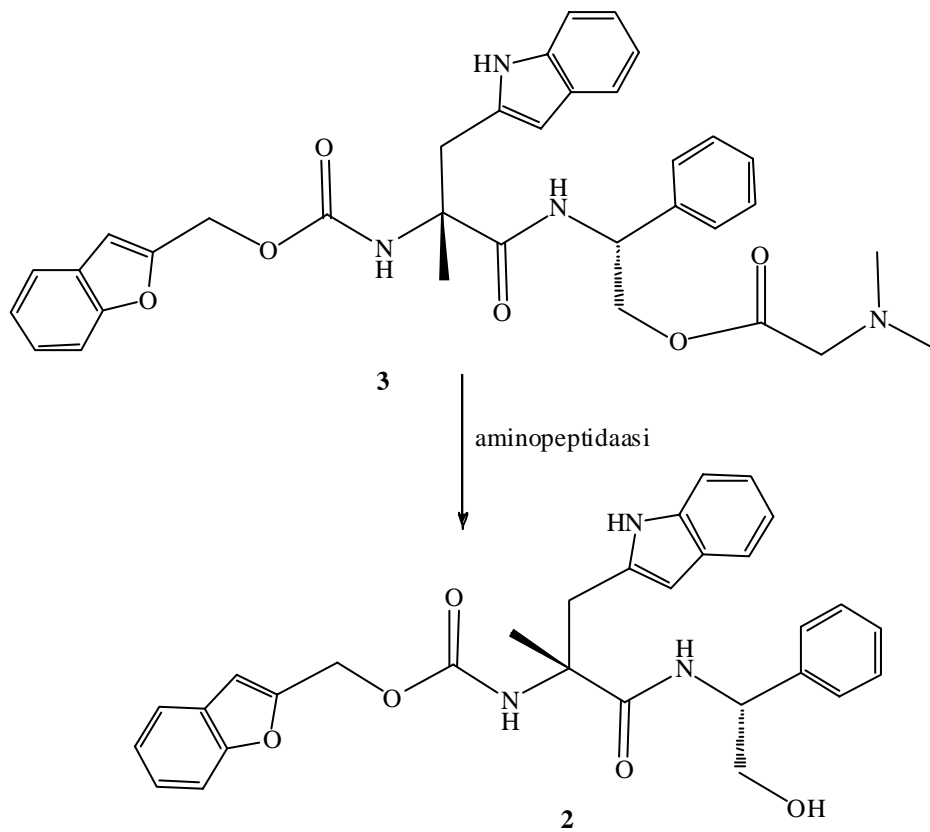
Aminohappoaihiolääkkeiden valmistamisessa haastavimpia vaiheita ovat synteesi sekä tuotteen puhdistaminen ja karakterisointi. Esimerkiksi mahdollisten suojaryhmien käyttö

synteesissä voi lisätä epäpuhtauksien ja sivutuotteiden määrää. Koska suurin osa aminohappoaihiolääkkeistä on yksinkertaisia estereitä tai amideja, ne eivät käytännössä muodosta reaktiivisia epäpuhtauksia. Kemialliselta rakenteeltaan karbamaatteja olevat ahiolääkkeet voivat kuitenkin vapauttaa hydrolysoituessaan formaldehydiä.⁸⁷

Aminohappoaihiolääkkeiden ongelmana on niiden pysymättömyys. Pysyvyydelle asettavat haasteita esimerkiksi intramolekulaarinen sykliisaatio ja aminohappojen mahdollinen rasemisaatio. Nämä riippuvat lääkeainemolekyylin ja aihio-osan välillä olevan sidoksen kemiallisesta pysyvyydestä. Esteri- ja amidisidoksen sisältävien ahiolääkkeiden pysyvyys on pH-riippuvaista. Yleisesti ottaen ne ovat vähiten pysyviä sekä korkeassa että matalassa pH:ssa ja pysyvimpiä siinä välillä. Juuri aminohappoaihiolääkkeiden pysyvyyteen liittyvistä ongelmista johtuen fosfaattihiolääkkeet ovat suositumpia vesiliukoisuutta lisäävinä ahiolääkkeinä.^{87,89}

4.1.2.4.3. CAM-4451:n aminohappoaihiolääkkeet

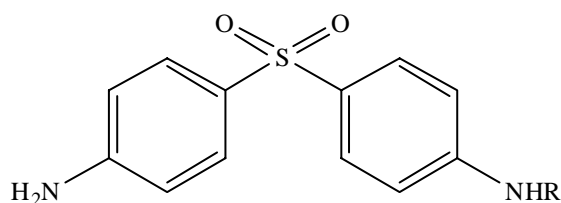
CAM-4451 (bentsofuran-2-yyli(*R*)-1-(((*R*)-2-hydroksi-1-fenylylietyyli)amino)-3-(1*H*-indol-2-yyli)-2-metyyli-1-oksopropan-2-yyli)karbamaatti) (**2**) (Kaavio 1) on neurokiniini 1 (NK1) -reseptorin antagonisti, joka estää substanssi P:n sitoutumisen NK1-reseptoreihin⁹². NK1-reseptorin antagonisteja käytetään masennuslääkkeinä (antidepressantit), ahdistusta lievittävinä lääkkeinä (anksiolyytit) sekä oksentelua hillitsevinä lääkkeinä (antiemeetit)^{93,94}. CAM-4451:n vesiliukoisuus on huono (alle 2 µg/ml). Chan *et. al.* valmistivat sen ahiolääkkeen liittämällä esteröintireaktion avulla rakenteeseen aminohappo leusiiniin⁹⁵. Tällöin vesiliukoisuus kasvaa arvoon 0,1 mg/ml. Kun aihio-osana käytetään *N,N*-dimetyyliglysiiniä, saadaan ahiolääke CAM-4562 (**3**) (Kaavio 1), jonka vesiliukoisuus (3 mg/ml) on noin 1500-kertainen CAM-4451:n vesiliukoisuuteen verrattuna. *N,N*-dimetyyliglysiinihiolääke hydrolysoituu selektiivisesti varsinaiseksi lääkeaineeksi ruoansulatuskanavan epiteelin harja- eli sukasaumassa aminopeptidaasien avulla (Kaavio 1).^{87,95}



Kaavio 1. CAM-4562:n (3) hydrolysoituminen aminopeptidaasin avulla CAM-4451:ksi (2).

4.1.2.4.4. Dapsonin aminohappoaihiolääkkeet

Dapsonilla (4,4'-diaminodifenyylisulfony) (**4a**) on tulehdusta ehkäiseviä (anti-inflammatorisia) ja pieneliöitä tuhoavia tai niiden kasvua ja lisääntymistä estäviä (antimikrobiaalisia) vaikutuksia⁹⁶. Pochopin *et. al.* syntetisoivat dapsonista useita sen aminohappojohdannaisia (Kuva 3), joiden ominaisuuksia mahdollisina aihiolääkkeinä testattiin⁹⁷. Dapsonin rakenteessa on kaksi reaktiivista aminoryhmää, mutta aihiolääkkeitä syntetisoitaessa aminohappo liitetään vain toiseen niistä. Tämä varmistetaan käyttämällä suojattua aminohappoa yksi ekvivalentti. Mahdollinen reaktiossa syntynyt sivutuote poistetaan puhdistamalla raakatuote pylväskromatografisesti. Dapsoni on symmetrinen molekyyli, joten aihio-osan liittäminen kumpaan tahansa aminoryhmään antaa saman lopputuotteen.⁹⁷



- 4a** R = H
4b R = *L*-alaniini
4c R = *L*-leusiini
4d R = *L*-fenyyialaniini
4e R = glysiini
4f R = *L*-lysiini

Kuva 3. Dapsonin (**4a**) ja sen aminohappoaihiolääkkeiden (**4b-f**) rakenteet.

Dapsonin vesiliukoisuutta voidaan lisätä valmistamalla siitä aminohappoaihiolääke (Taulukko 2). Kun aihio-osana käytetään aminohappo lysiniä, vesiliukoisuus kasvaa eniten ja laajimmalla pH-alueella. Tämä johtuu osittain lysinin sivuketjussa olevasta primaarisesta aminoryhmästä, joka on protonoitunut fysiologisessa pH:ssa. Aihio-osana kokeilluista aminohapoista ainoastaan fenyyialaniini ei merkittävästi paranna vesiliukoisuutta. Dapsonin ahiolääkkeiden vesiliukoisuus riippuu siis ympäristön pH:sta ja valitusta aminohaposta.⁹⁷

Taulukko 2. Dapsonin (**4a**) ja sen aminohappoaihiolääkkeiden (**4b-f**) liukoisuus (mg/ml) vedessä (25 °C) ja fosfaattipuskurissa (pH 7,4).⁹⁷

| Rakenne | Liukoisuus (mg/ml) vedessä | Liukoisuus (mg/ml) fosfaattipuskurissa |
|-----------|----------------------------|--|
| 4a | 0,16 | 0,14 |
| 4b | > 30 | 6,6 |
| 4c | > 25 | 0,31 |
| 4d | 1,3 | 0,002 |
| 4e | > 15 | 0,87 |
| 4f | > 65 | > 65 |

4.1.2.4.5. Metronidatsolin aminohappoaihiolääkkeet

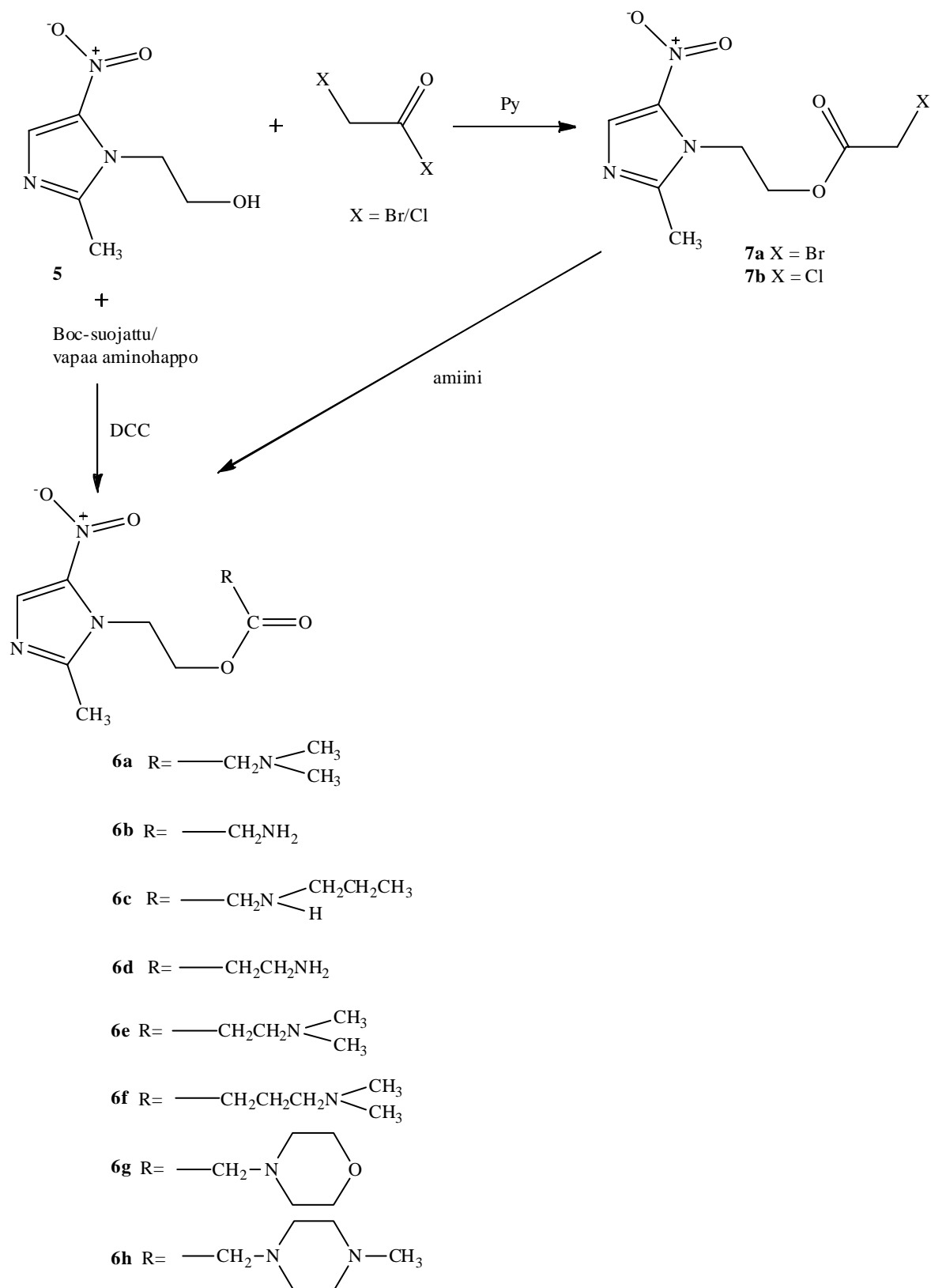
Metronidatsoli (2-(2-metyyli-5-nitro-1*H*-imidatsol-1-yyli)etanol) (**5**) (Kaavio 2, sivu 21) on antibiootti. Se otetaan tavallisesti suun kautta, mutta myös suonensisäinen annostelu on mahdollinen erityisesti tilanteissa, jolloin lääke on annettava nopeasti potilaalle. Metronidatsolin vesiliukoisuuksia on esitetty taulukossa 3. Metronidatsolin vesiliukoisuus

ei ole riittävä, jotta se voitaisiin annostella injektiona. Tästä johtuen suonensisäinen annostelu on hoidettava infuusiona. Riittävän lääkemäärän saamiseksi elimistöön infuusio on annettava potilaalle joka kahdeksas tunti.^{98,99}

Taulukko 3. Metronidatsolin (**5**) vesiliukoisuus (mg/ml) mitattuna neljässä eri pH:ssa, lämpötilassa 37 °C.¹⁰⁰

| pH | Vesiliukoisuus (mg/ml) |
|-----|------------------------|
| 1,0 | 30,6 |
| 3,0 | 14,1 |
| 5,0 | 12,8 |
| 7,0 | 11,6 |

Metronidatsolissa (**5**) on yhtenä funktionaalisenä ryhmänä hydroksyyli-ryhmä, joka voidaan esteröidä. Bundgaard *et. al.* syntetisoivat metronidatsolista vesiliukoisempia aminohappoaihiolääkkeitä (**6a-h**), jotta lääkeaine voitaisiin annostella injektiona (Kaavio 2)⁹⁹. Lisäksi tarkasteltiin ahiolääkkeiden entsymaattisen hydrolyysin nopeutta. Aminohappoaihiolääkkeet muodostetaan joko vapaan tai Boc-suojatun (*tert*-butyylioksidikarbonyyli) aminohapon ja metronidatsolin välillä *N,N'*-disykloheksyylikarbodi-imidin (DCC) läsnä ollessa tapahtuvalla kondensaatioreaktiolla tai antamalla sopivan amiinin reagoida metronidatsolin bromi- tai klooriasetaattiesterin (**7a-b**) kanssa (Kaavio 2). Kyseiset esterit on muodostettu ensin antamalla metronidatsolin (**5**) reagoida sopivissa olosuhteissa klooriasetyylikloridin tai bromiasetyylibromidin kanssa. Jodiasetaatti muodostetaan edellisistä poiketen korvaamalla metronidatsoliklooriasetaatin kloori jodilla antamalla sen reagoida kaliumjodidin (KI) kanssa. Syntetisoidut metronidatsolin aminohappoaihiolääkkeet suolamuodossa osoittautuivat metronidatsolia vesiliukoisemmiksi. Vesiliukoisuuskokeita näistä ahiolääkkeistä ei ole julkaistu.⁹⁹



Kaavio 2. Metronidatsolin aminohappoaihiolääkkeiden (**6a-h**) syntesi.

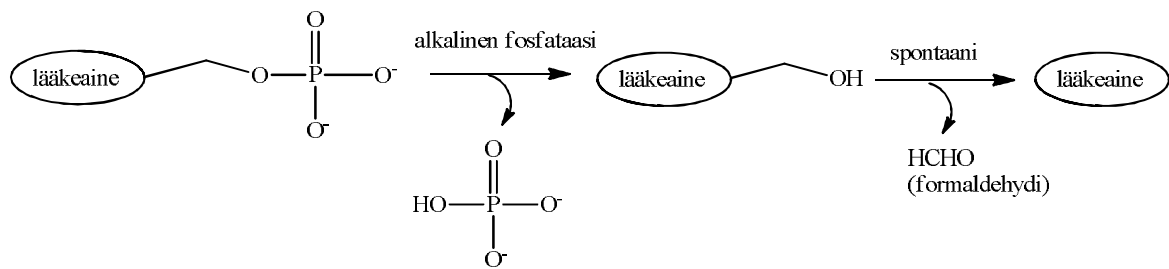
4.1.2.5. Fosfaattiesteriaihiolääkkeet

4.1.2.5.1. Yleistä

Fosforihappo esiintyy vesiliuoksessa neljässä eri muodossa liuoksen pH:sta riippuen. Fosforihapolla on kolme pK_a -arvoa (2,16, 7,21 ja 12,32)¹⁰¹. Kirjallisuudessa on esitetty myös muita pK_a -arvoja^{102,103}. Fosfaattiesterit ovat fosforihapon mono-, di- tai triestereitä. Fosfaattiestereillä on yleensä alhainen pK_a -arvo, ja esimerkiksi useimpien fosfodiestereiden pK_a -arvot ovat noin 1,5. Fysiologisessa pH:ssa fosfaattiesterit ovat täysin deprotonoituneita eli esiintyvät anioneina. Poikkeuksen muodostavat fosfaattitriesterit, joiden rakenteessa ei ole ionisoituvaa protonia liittyneenä fosfaattiryhmään. Ne ovat siksi neutraaleja pH:sta riippumatta.^{104,105}

Fosfaattiestereitä käytetään aihio-osina parantamaan lääkeaineiden huonoa vesiliukoisuutta. Fosfaattiesteriaihiolääkkeitä on pyritty kehittämään sekä suun kautta otettaviksi että suonensisäiseen annosteluun. Fosfaattiesterit ovat yleensä riittävän pysyviä sekä vesiliuoksessa että kiinteinä, jotta niitä voidaan käyttää aihio-osana suonensisäisesti annosteltavissa aihiolääkkeissä. Tällaisista fosfaattiesteriaihiolääkkeistä onkin olemassa useita onnistuneita esimerkkejä. Sen sijaan suun kautta otettavien fosfaattiesteriaihiolääkkeiden kehittäminen on osoittautunut hankalaksi ja niistä on olemassa vain muutamia markkinoille asti päätyneitä valmisteita.^{10,20,72,106–108}

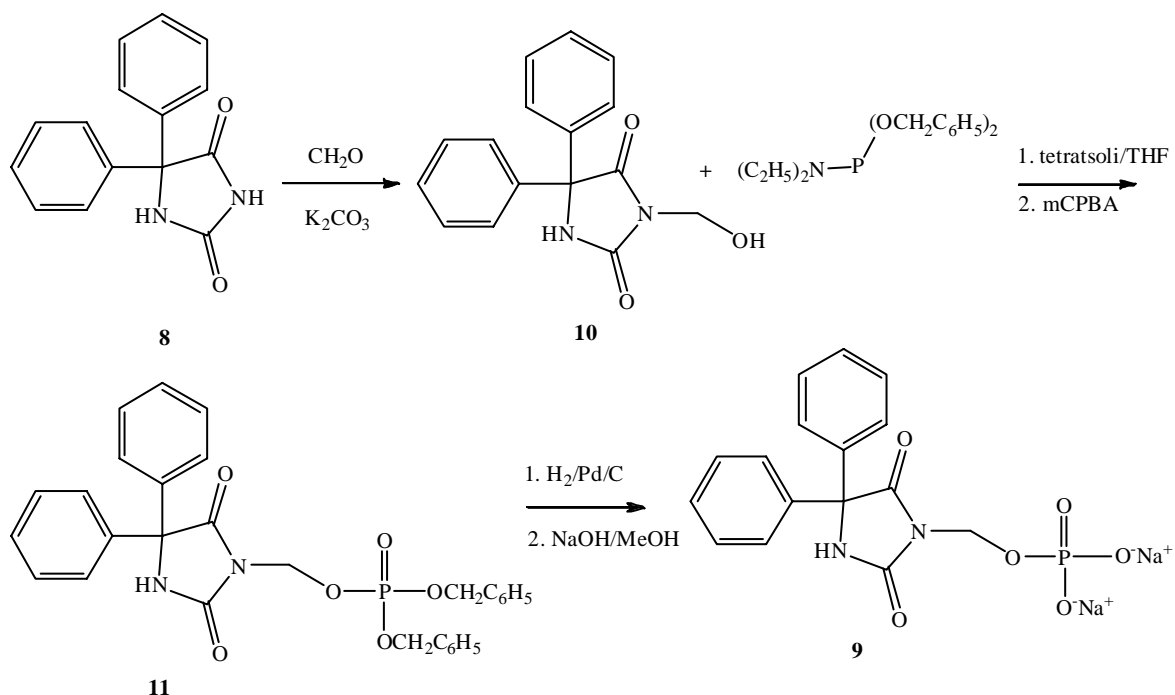
Lääkeinemolekyylissä on oltava sopiva funktionaalinen ryhmä, johon fosfaattiesteri voidaan liittää. Tällainen on tyypillisesti rakenteessa oleva hydroksyyli- tai aminoryhmä, johon fosfaattiesteri liittyy joko suoraan tai linkkerin välityksellä. Fosfaattiesterit voidaan hydrolysoida elimistön omien fosfataasientsyymien avulla, jolloin aktiivinen lääkeaine vapautuu (Kaavio 3). Mikäli kyseessä on suun kautta otettava fosfaattiaihiolääke, hydrolysoituminen tapahtuu yleensä jo ennen imeytymistä tai viimeistään imeytymisen aikana suolessa. Tällöin ionisoitunut aihiolääkerakenne ei heikennä varsinaisen lääkeaineen solunläpäisevyyttä. Jos hydrolysoitumista ei tapahdu, on fosfaattiaihiolääkkeen erittäin polaarisenä molekyylinä vaikea läpäistä passiivisesti suolen limakalvoa.^{11,72,78,81,89,107–109}



Kaavio 3. Alkalisen fosfataasin katalysoima defosforylaatio.

4.1.2.5.2. Fosfentyoiini – fentyoiinin fosfaattiesteriaihiolääke

Fentyoiini (5,5-difenyylimidatsolidiini-2,4-dioni) (**8**) on hydantoiinin 5,5-disubstituoitu johdannainen. Sitä käytetään epilepsialääkkeenä. Fosfentyoiini (**9**) on fentyoiinin fosfaattiesteriaihiolääke, jossa aihio-osa on liittynyt fentyoiinin heikosti happaman aminoryhmän (pK_a -arvo 8,3) tyypeen linkkerin välityksellä. Fosfentyoiinin synteesissä fentyoiini reagoi formaldehydin kanssa emäksisessä vesiliuoksessa muodostaen 3-hydroksimetyylifentyoiinia (**10**) (Kaavio 4). Fosfentyoiinia voidaan syntetisoida usealla tavalla. Stella on esittänyt fosfentyoiinin synteesin käyttäen lähtöaineena 3-hydroksimetyylifentyoiinia (Kaavio 4)¹¹⁰. Sen annetaan reagoida fosfiittidiesterin monoamidin kanssa tetrahydrofuraanissa (THF). Hapettaminen käyttämällä *m*-klooriperoksibentsoehappoa tuottaa 3-hydroksimetyylifentyoiinin dibentsyyli-fosfaattiesterin (**11**). Lopputuotteena saadaan fosfentyoiini (**9**).^{62,110,111}



Kaavio 4. Fosfentyoiinin (9) syntesi.

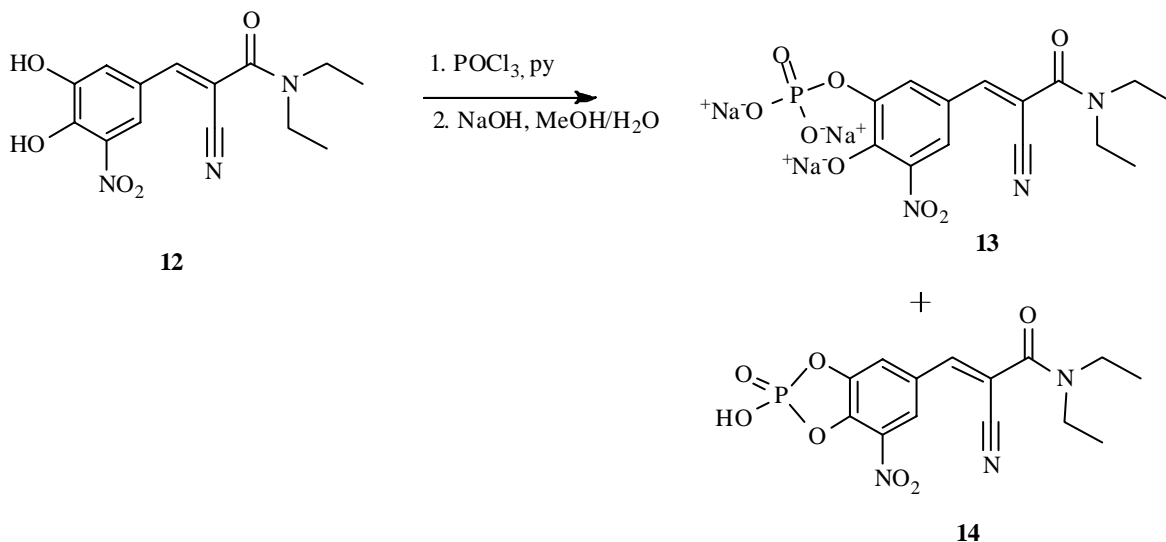
Fosfentyoiinin vesiliukoisuus on huomattavasti parempi kuin fentytoiinin (Taulukko 4, sivu 29). Fosfentyoiini hydrolysoituu elimistössä entsymaattisesti 3-hydroksimetyylifentytoiiniksi, joka muuttuu edelleen spontaanisti fentytoiiniksi (Kaavio 3). Fosfentyoiinia voidaan annostella sekä suonen- että lihaksensisäisesti. Sen on todettu aiheuttavan vähemmän paikallisia haittavaikutuksia ja kudosaivourioita kuin fentytoiinin. Molempien haittavaikutuksia ovat esimerkiksi matala verenpaine ja rytmihäiriöt.^{20,89,111}

4.1.2.5.3. Entakaponin fosfaattiesteriaihiolääke

Entakaponi ((*E*)-2-syano-*N,N*-dietyyli-3-(3,4-dihydroksi-5-nitrofenyyli)propenamidi) (12) (Kaavio 5) on suomalainen lääkekeksintö, joka on tarkoitettu Parkinsonin taudin hoitoon. Entakaponi tehostaa Parkinsonin taudin hoitoon perinteisesti käytetyn levodopan (3,4-dihydroksifenyyli-*L*-alaniini) vaikutusta. Entakaponi on 3,4-dihydroksi-5-nitrobentsylideenin johdannainen ja potentiaalinen COMT-entsyymin (katekoli-O-metyylitransferaasi) estäjä. COMT-entsyymillä on tärkeä rooli levodopan metaboliassa elimistössä. Levodopa on dopamiinin prekursori, ja Parkinsonin tautia sairastavilla potilailla on aivoissa dopamiinin puutos.^{11,112,113}

Entakaponi on kliinisessä käytössä Parkinsonin taudin hoidossa, mutta sen imeytyminen suun kautta annosteltuna on melko huonoa, ja imeytymisessä potilaiden

välillä on suurta vaihtelua. Syytä entakaponin huonoon imeytymiseen ei tarkasti tiedetä, mutta sen arvellaan johtuvan ainakin osittain lääkeaineen huonosta vesiliukoisuudesta mahalaukun pH-olosuhteissa.^{114,115}



Kaavio 5. Entakaponin fosfaattiesteriaihiolääkkeen (**13**) synteesi.

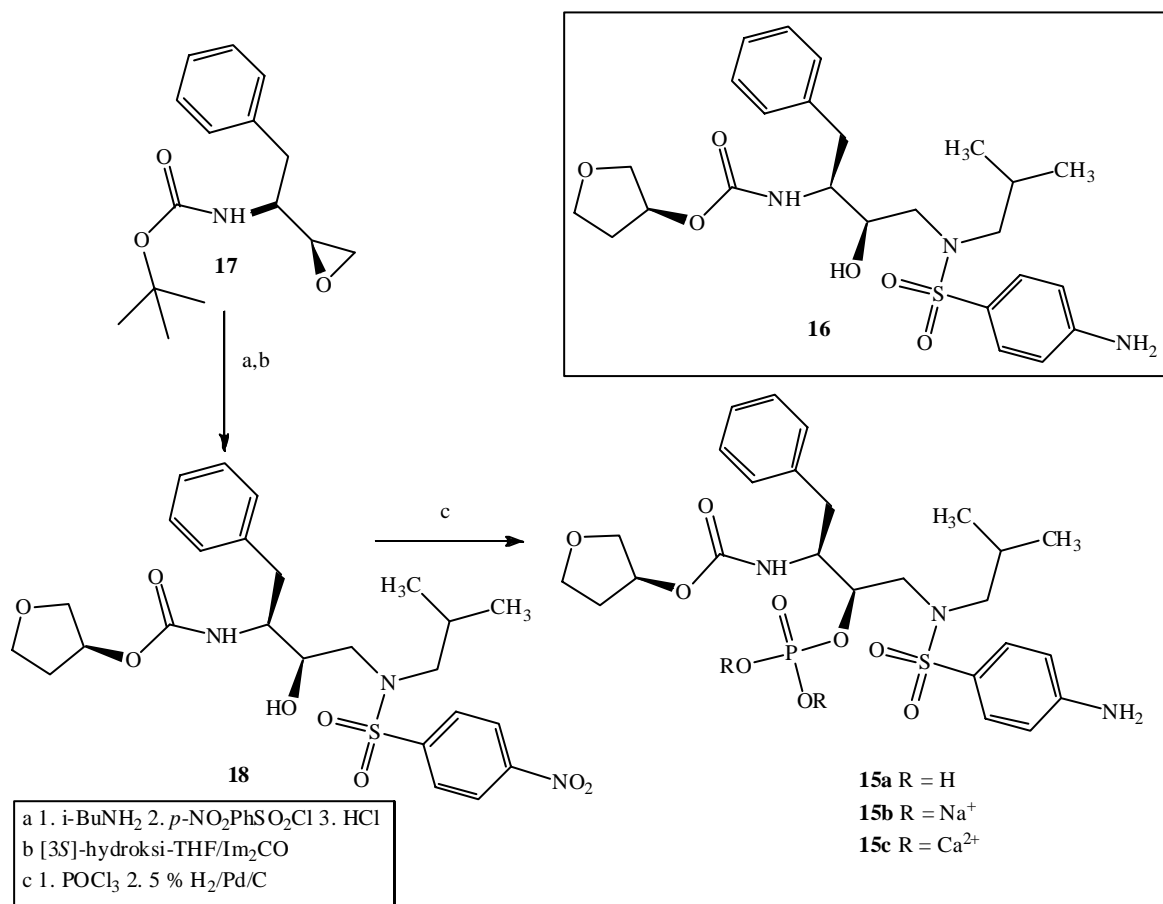
Leppänen *et. al.* syntetisoivat entakaponin fosfaattiesteriaihiolääkkeen (**13**) sekoittamalla fosforioksidikloridia ja entakaponia (**12**) pyridiinissä (Kaavio 5)¹¹². Synteesin sivutuotteena muodostuu myös syklistä fosfaattia (**14**). Entakaponin fosfaattiesteriaihiolääkkeen vesiliukoisuus on huomattavasti parempi kuin entakaponin vesiliukoisuus (Taulukko 4, sivu 29). Entakaponin fosfaattiesteri on pysyvä sekä fosfaattipuskurissa että ihmisen seeruminäytteissä.^{11,112}

4.1.2.5.4. Fosamprenaviiri – amprenaviirin fosfaattiesteriaihiolääke

Fosamprenaviiri ({{[(2*R*,3*S*)-1-[*N*-(2-metyylipropyyli)(4-aminobentseeni)sulfonamido]-3-{{[(3*S*)-oksolan-3-yylioksi]karbonyyli} amino)-4-fenyylibutan-2-yyli]oksi} fosfonaatti) (**15a**) (Kaavio 6) on suun kautta otettava viruksia tuhoava tai niiden lisääntymistä estävä (antiviraalinen) lääke, jota käytetään yhdessä muiden vastaavanlaisten lääkkeiden kanssa ihmisen immuunikatovirukselle (HIV) positiivisten potilaiden hoidossa. Fosamprenaviiri on HIV-proteaasin estäjä amprenaviirin (**16**) vesiliukoinen fosfaattiaihiolääke, joka saadaan fosforyloimalla amprenaviirin sekundaarinen hydroksyyli ryhmä (Kaavio 6)^{20, 116-119}

Amprenaviiri on vain osittain vesiliukoinen (Taulukko 4, sivu 29). Fosamprenaviirin natriumsuolan (**15b**) ja kalsiumsuolan (**15c**) sekä vapaan hapon vesiliukoisuudet riippuvat pH:sta. Natriumsuolan ja vapaan hapon vesiliukoisuus pH:ssa 1,0-8,0 on yli 3 mg/ml.

Fysiologisessa pH:ssa fosamprenaviirin natriumsuolan vesiliukoisuus on jopa yli 100 mg/ml. Kalsiumsuolan vesiliukoisuus on pH:ssa 3,0-4,0 yli 100 mg/ml. Fosamprenaviirin kalsiumsuola on olomuodoltaan kiinteä, kiteinen. Natriumsuola on kiinteä, amorfinen aine. Fosamprenaviiri hydrolysoituu ruoansulatuskanavassa nopeasti alkalisen fosfataasin avulla amprenaviiriksi. Tästä johtuen vain hyvin vähäinen määrä fosamprenaviiria päätyy systeemiseen verenkiertoon.¹¹⁶⁻¹²⁰



Kaavio 6. Fosamprenaviirin (**15a**) sekä sen natriumsuolan (**15b**) ja kalsiumsuolan (**15c**) synteesi.

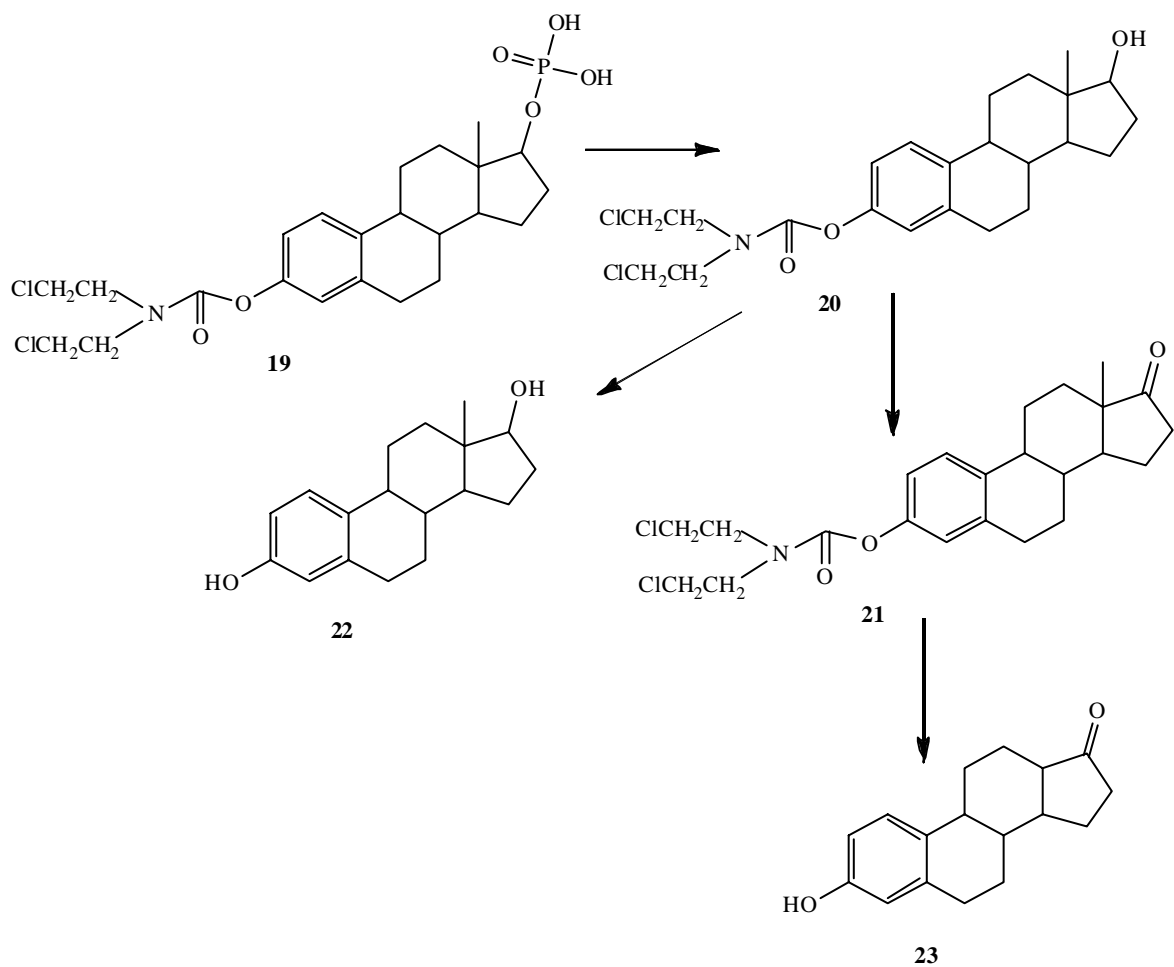
Fosamprenaviirin markkinoilla oleva muoto on sen kalsiumsuola. Kalsiumsuolan farmaseuttiset ominaisuudet on todettu natriumsuolan ominaisuuksia paremmiksi. Vaikka natriumsuola on vesiliukoisempi, on se erittäin hygroskooppinen. Kalsiumsuola taas hajoaa matalassa pH:ssa, mutta sen vesiliukoisuus on riittävä fysiologisessa pH:ssa. Näiden perusteella kalsiumsuola on valittu aihiolääkkeen lopulliseksi muodoksi ja siitä on kehitetty fosfaattiaihiolääke, jonka avulla potilaan vuorokaudessa ottamien annoskertojen määrää on voitu vähentää. Amprenaviiri on kapselimuotoinen lääke, jota on otettava jopa

kahdeksan kapselia vuorokaudessa. Fosamprenaviiri on tablettimuotoinen ja siinä on vaikuttavaa ainetta enemmän kuin kapselimuotoisessa lääkkeessä. Riittääkin, että fosamprenaviiria otetaan neljä tablettia vuorokaudessa. Tämä lisää potilaiden hoitomyöntyvyyttä ja vähentää lääkkeestä aiheutuvia sivuvaikutuksia. Vaikuttavaa ainetta imeytyy elimistöön sama määrä kuin kapselimuotoisista valmisteista.^{20,116,120}

Furfine *et. al.* ovat esittäneet fosamprenaviirin synteessin käyttäen lähtöaineena (1*S*)-*tert*-butyyli-*N*-[1-((2*S*)-2-oksiranyyli)-2-fenylylietyyli]karbamaattia (**17**) (Kaavio 6)¹¹⁷. Sen annetaan reagoida isobutyylimamiinin, 4-nitrobentseenisulfonyylikloridin ja suolahapon (HCl) kanssa, jolloin muodostuu välituotteena yhdisteen (**17**) suola. Toisessa vaiheessa *N,N'*-karbonyylidi-imidatsolin, (*S*)-tetrahydrofuran-3-olin ja edellä valmistetun suolan annetaan reagoida keskenään. Saadun välituotteen (**18**) sekä pyridiinin ja 4-metyyli-2-pentanonin joukkoon lisätään fosforioksikloridi sekä katalyyttinen määrä palladiumaktivoitua hiiltä ja kalsiumasettaatti. Lopuksi muodostunut fosamprenaviiri tai sen suola (**15a-c**) pestään asetonilla ja kuivataan alipaineessa.¹¹⁷

4.1.2.5.5. Estramustiinifosfaatti

Estramustiinifosfaatti (**19**) (Kaavio 7) on 17β-estradiolin johdannainen. Se on estramustiinin ((17β)-17-hydroksiestra-1(10),2,4-trien-3-yyli-bis(2-kloorietyyli)karbamaatti) (**20**) vesiliukoinen fosfaattiaihiolääke. Estramustiini on käytännössä veteen liukenematon (Taulukko 4, sivu 29), eikä esiinny ionisoituvassa muodossa. Se on sytotoksinen eli kasvainsoluja tuhoava lääke. Lisäksi se alentaa plasman testosteronitasoja. Alun perin estramustiini kehitettiin rintasyövän hoitoon, mutta nykyään sitä käytetään pitkälle edenneen eturauhassyövän hoidossa. Lisäksi estramustiinia on tutkittu potentiaalisena vaihtoehtona myös muiden syöpien hoidossa. Lääkkeestä on olemassa sekä suonensisäisesti että suun kautta annosteltava valmistemuoto.^{10,11,121–123}



Kaavio 7. Estramustiinifosfaatti (**19**) ja estramustiini (**20**) sekä metaboliatuotteet (**21-23**).

Suun kautta otettuna estramustiinifosfaatti metaboloituu ruoansulatuskanavassa nopeasti estramustiiniksi (**20**), ja tällöin noin 75 prosenttia lääkkeestä imeytyy. Mikäli estramustiinifosfaatti annetaan injektiona, sen metaboloituminen on hitaampaa. Estramustiini voi edelleen metaboloitua estromustiiniksi (**21**) (Kaavio 7). Siinä estramustiinin hydroksyyyliryhmä on hapettunut ketoryhmäksi. Estramustiinin ja estromustiinin metaboliatuotteita ovat estradioli (**22**) ja estroni (**23**) (Kaavio 7). Ne kykenevät selektiivisesti tunkeutumaan eturauhasen kasvaimen soluihin. Tästä seuraa solujen mitoosin eli tumanjakautumisen estyminen.^{10,11,122,123}

Taulukko 4. Eräiden lääkeaineiden ja niiden fosfaattiesteriaihiolääkkeiden vesiliukoisuuksia.¹¹

| Lääkeaine | Lääkeaineen vesiliukoisuus (mg/ml) | Fosfaattiesteriaihiolääke | Fosfaattiesteriaihiolääkkeen vesiliukoisuus (mg/ml) |
|---------------|------------------------------------|---|---|
| Fenytotiini | 0,019 (pH 9,0) | Fosfenytotiini | 140 (pH 9,0) |
| Entakaponi | 1,75 (pH 7,4) | Entakaponin fosfaattiesteriaihiolääke | 30 (pH 7,4) |
| Amprenaviiri | 0,04 (pH 3,0-4,0) | Fosamprenaviirin fosfaattiesteriaihiolääke (natriumsuola) | ≥ 3,0 (pH-riippuvainen) |
| | | Fosamprenaviirin fosfaattiesteriaihiolääke (kalsiumsuola) | ≥ 0,3 (pH-riippuvainen) |
| Estramustiini | < 0,001 (pH 6,5) | Estramustiinifosfaatti | 0,2 (pH 6,5) |

4.1.2.6. Hemisukkinaattiesterit

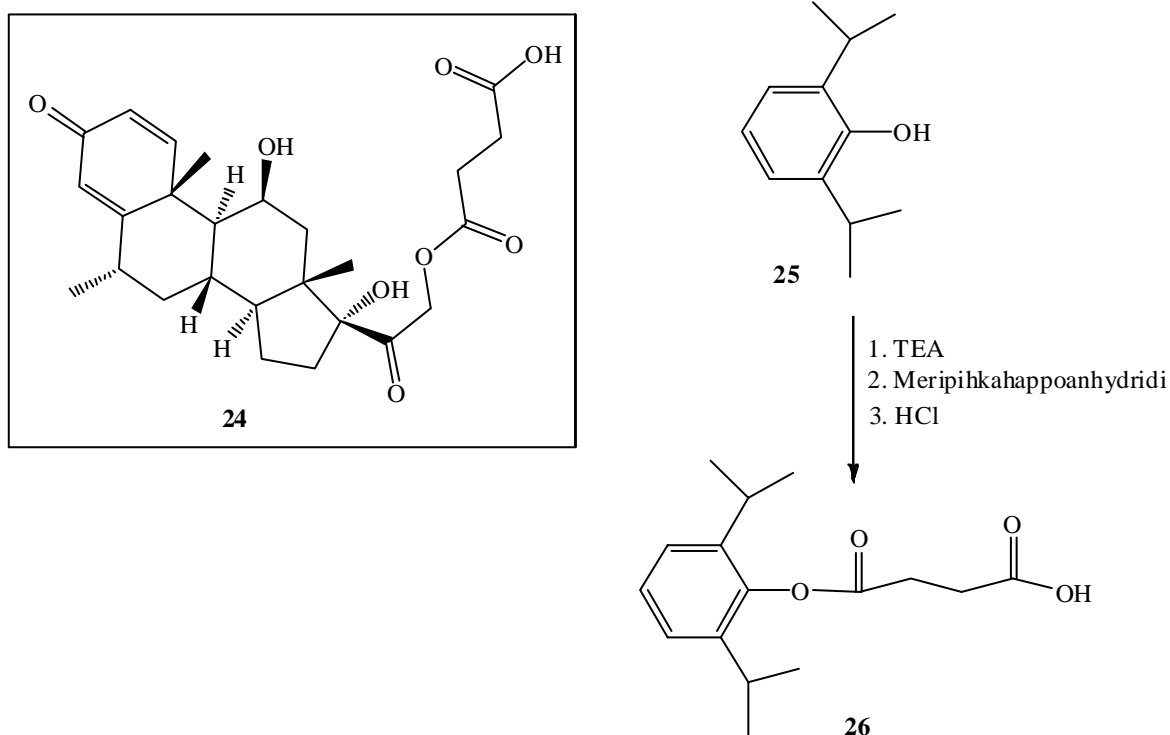
Glukokortikoideja käytetään suurina annoksina sokin hoitoon. Niitä ei voida annostella suonensisäisesti huonosta vesiliukoisuudesta johtuen. Esteröimällä glukokortikoidi meripihka- tai fosforihapolla saadaan steroidin vesiliukoinen johdannainen, joka voidaan annostella suonensisäisesti. Yksi yleisimmistä glukokortikoidiestereistä on metyyliprednisoloni-hemisukkinaatti. Hemisukkinaattiesterit eivät metaboloitu elimistössä nopeasti tai täydellisesti varsinaiseksi lääkeaineeksi.^{107,124}

4.1.2.6.1. Metyyliprednisolonin ja propofolin hemisukkinaattiesterit

Metyyliprednisolonin sekä sen kahden vesiliukoisen esteraihiolääkkeen, fosfaattiesterin ja hemisukkinaattiesterin (**24**) (Kaavio 8), farmakokinetiikkaa on tutkittu terveillä vapaaehtoisilla. Tutkimuksessa lääkeaineet annosteltiin suonensisäisesti. Metyyliprednisolonin fosfaattiesteri muuttuu elimistössä nopeammin ja tehokkaammin varsinaiseksi lääkeaineeksi kuin sen hemisukkinaattiesteri. Noin 10 prosenttia elimistöön imeytyneestä metyyliprednisoloni-hemisukkinaatista erittyy virtsaan muuttumattomana, eikä siis metaboloitu vapaaksi alkoholiksi. Hemisukkinaattiesteri voi myös metaboloitua

elimistössä joksikin muuksi yhdisteeksi kuin metyyliprednisoloniksi suonensisäisen annostelun jälkeen.^{124,125}

Vansant *et. al.* ovat syntetisoineet anestesia-aineena käytettävästä propofolista (2,6-diisopropyylifenoli) (**25**) sen vesiliukoisen hemisukkinaattiesteriäihiolääkkeen (**26**) (Kaavio 8)¹²⁶. Propofolin vesiliukoisuus on 0,146 mg/ml 0,05-molaarisessa fosfaattipuskuriliuoksessa (lämpötilassa 25 °C)¹²⁷. Hemisukkinaattiesteriäihiolääke syntetisoidaan käsittelemällä propofolia meripihkahappoanhydridillä trietyyliamiinissa (TEA).¹²⁸ Aihiolääkkeen vesiliukoisuusarvoa ei ole esitetty kirjallisuudessa.



Kaavio 8. Metyyliprednisolonin hemisukkinaattiesterin (**24**) rakenne sekä propofolin hemisukkinaattiesterin (**26**) synteesi.

4.1.2.7. Sulfaattiesterit

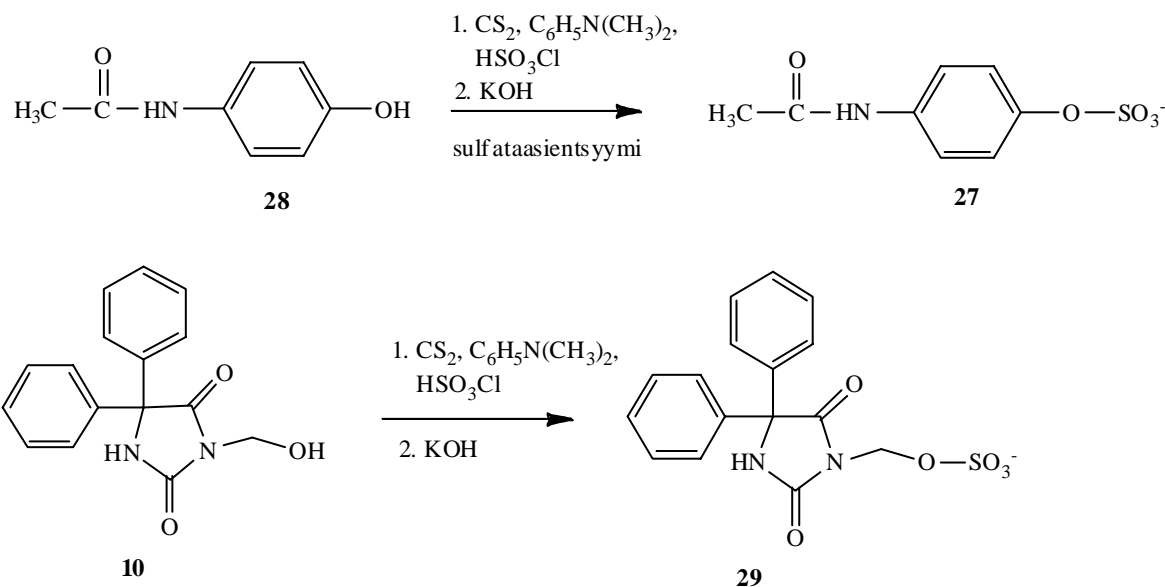
Sulfaattiesterit ovat kemiallisesti pysyviä. Niiden on todettu hydrolysoituvan entsymaattisesti melko huonosti. Tämä vähentääkin sulfaattiestereiden käyttöä potentiaalisina vesiliukoisina aihiolääkkeinä, ja sulfaattiryhmän käyttökelpoisuudesta aihio-osana on olemassa erilaisia näkemyksiä¹²⁸⁻¹³¹. Sulfaattiryhmä aihio-osana lisää lääkeaineen vesiliukoisuutta.^{15,128,131}

4.1.2.7.1. Parasetamolin ja fenytoiinin sulfaattiesteriaihiolääkkeet

Williams *et. al.* syntetisoivat asetaminofeenin eli parasetamolin (*N*-(4-hydroksifenyyl)etaanimidi) sulfaattiesterin (**27**) ja 3-sulfonyylioksimetyyli-5,5-difenyylihydantoiinin (**29**) mukailemalla kirjallisuusmenetelmää (Kaavio 9)¹²⁹. Lisäksi yhdisteitä arvioitiin mahdollisina parasetamolin (**28**) ja fenytoiinin (**8**) sulfaattiesteriaihiolääkkeinä. Molemmat aihiolääkkeet ovat kemiallisesti pysyviä neutraaleissa olosuhteissa. Ne eivät myöskään metaboloitu merkittävästi happamissa olosuhteissa, kuten ihmisen mahalaukussa.¹²⁹

Synteesissä kloorisulfonihappo lisätään tipoitain hiilisulfidiin liuotetun dimetyylianiiliinin joukkoon kylmissä olosuhteissa. Seosta lämmitetään, ja joukkoon lisätään lähtöaineista parasetamoli (**28**) tai 3-hydroksimetyylifenytoiini (**10**). Seos kaadetaan nopeasti kylmän kaliumhydroksidin (KOH) joukkoon ja muodostunutta kiinteää raakatuotetta pestään kylmällä etanolilla (EtOH), jonka jälkeen se kuivataan alipaineessa (Kaavio 9).^{129,132}

Williams *et. al.* totesivat, ettei kumpikaan syntetisoiduista sulfaattiestereistä sopinut parasetamolin tai fenytoiinin aihiolääkkeeksi, sillä ne eivät hajonneet riittävän nopeasti elimistössä. Williamsin *et. al.* mukaan sulfaattiestereiden valinta aihio-osiksi liitettäväksi alkoholisiin ja fenolisiin hydroksyyliiryhmiin ei ole mielekäästä, sillä yleisesti niiden ongelmat liittyvät nimenomaan metaboloitumiseen.¹²⁹



Kaavio 9. Parasetamolin sulfaattiesterin (**27**) ja 3-sulfonyylioksimetyyli-5,5-difenylihydantoinin (**29**) synteesi. Parasetamolin sulfaattiesterin synteesiä katalysoi mahdollisesti sulfataasientsyymi.¹²⁹

4.1.2.7.2. Prednisolonin ja deksametasonin sulfaattiesteriaihiolääkkeet

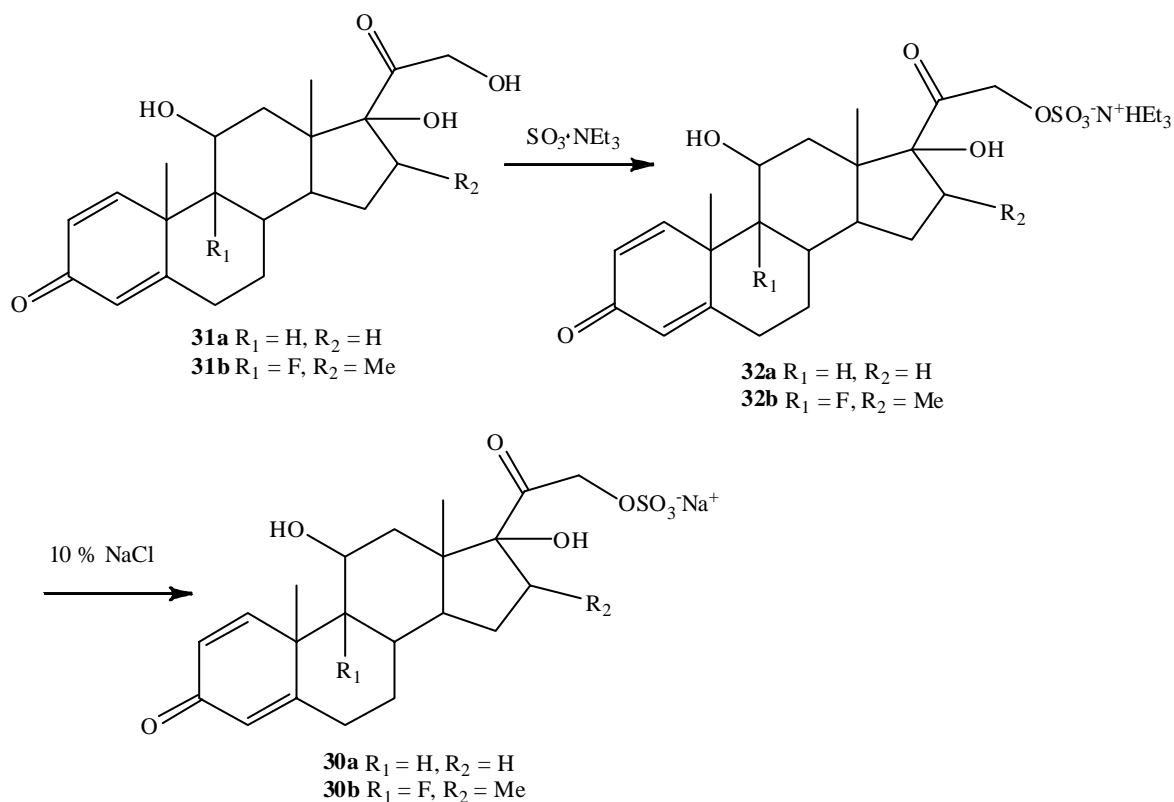
Sopivan aihio-osan valinta on tärkeää suunniteltaessa esimerkiksi sellaisia aihiolääkkeitä, joiden metaboloituminen ja imeytyminen tapahtuu spesifisesti paksusuolella. Suun kautta otettavan aihiolääkkeen on oltava pysyvä elimistön muissa olosuhteissa, eikä se saa imeytyä suolen aiemmassa osassa. Aihio-osan ja varsinaisen lääkeainemolekyylin välillä olevan linkkerin tulee hajota selektiivisesti vasta paksusuolella, jolloin aktiivinen lääkeaine vapautuu.¹³⁰

Doh *et. al.* tarkastelivat sulfaattiestereiden hyödyllisyyttä aihiolääkkeinä paksusuolen olosuhteissa¹³⁰. Tätä varten syntetisoitiin prednisoloni-21-sulfaatin natriumsuola (**30a**), jossa prednisolonin (**31a**) hydroksyyli-ryhmä esteröityy (Kaavio 10). Synteesi kulkee välivaiheen (**32a**) kautta. Valmistetun aihiolääkkeen ominaisuuksia tutkittiin eläinkokeiden avulla. Hypoteesin mukaan kyseinen sulfaattiesteriaihiolääke on pysyvä, eikä siis imeydy ruoansulatuskanavassa ennen paksusuolta. Lisäksi oletettiin, että hydrolyysi prednisoloniksi tapahtuu vasta paksusuolella sulfataasientsyymien avulla. Näin ollen aktiivinen lääkeaine olisi käytettävissä paksusuolen alueen tulehduksellisten tilojen hoitoon.¹³⁰

Doh *et. al.* totesivat, että prednisolonin sulfaattiesteriaihiolääke on mahdollista valmistaa hyvällä saannolla. Aihiolääke on prednisolonia vesiliukoisempia, sillä prednisolonin vesiliukoisuus on 0,2 mg/ml (lämpötilassa 37 °C)¹³³ ja

sulfaattiesteriaihiolääkkeen 46,2 mg/ml. Lisäksi saatiin viitteitä siitä, että sulfaattiesteriaihiolääke on kemiallisesti ja entsyymaattisesti pysyvä kulkeutuessaan suolistossa. Tämä viittaa siihen, että sen hydrolyysi aktiiviseksi lääkeaineeksi tapahtuu spesifisesti vasta paksusuolella. Tulosten perusteella kyseinen sulfaattiesteriaihiolääke olisi lupaava vaihtoehto kehitettäessä nimenomaan paksusuolella metaboloituvaa aihiolääkettä.¹³⁰

Toinen esimerkki paksusuolella mahdollisesti spesifisesti metaboloituvasta sulfaattiesteriaihiolääkkeestä on Kimin *et. al.* syntetisoima ja tarkastelema deksametasonin sulfaattiesteriaihiolääke, deksametasoni-21-sulfaatin natriumsuola (**30b**) (Kaavio 10)¹³¹. Synteesi kulkee välivaiheen (**32b**) kautta. Hypoteesin mukaan sulfaattiryhmän aiheuttama rakenteen lisääntynyt hydrofiilisyys sekä sulfataasientsyymien vähäinen määrä suoliston aiemmissä osissa mahdollistaisivat suun kautta otetun sulfaattiesteriaihiolääkkeen kulkeutumisen muuttumattomana paksusuoleen. Tulosten perusteella aihiolääke on huomattavasti vesiliukoisempi kuin deksametasoni (**31b**), sillä deksametasonin vesiliukoisuus on 0,1 mg/ml¹³⁴ ja aihiolääkkeen 14,4 mg/ml. Kyseistä aihiolääkettä voidaanakin pitää potentiaalisena paksusuolella metaboloituvana deksametasonin sulfaattiesteriaihiolääkkeenä.¹³¹



Kaavio 10. Prednisolonin sulfaattiesteriaihiolääkkeen (**30a**) ja deksametasonin sulfaattiesteriaihiolääkkeen (**30b**) synteesi.

4.1.2.8. Muita esteraihiolääkkeitä

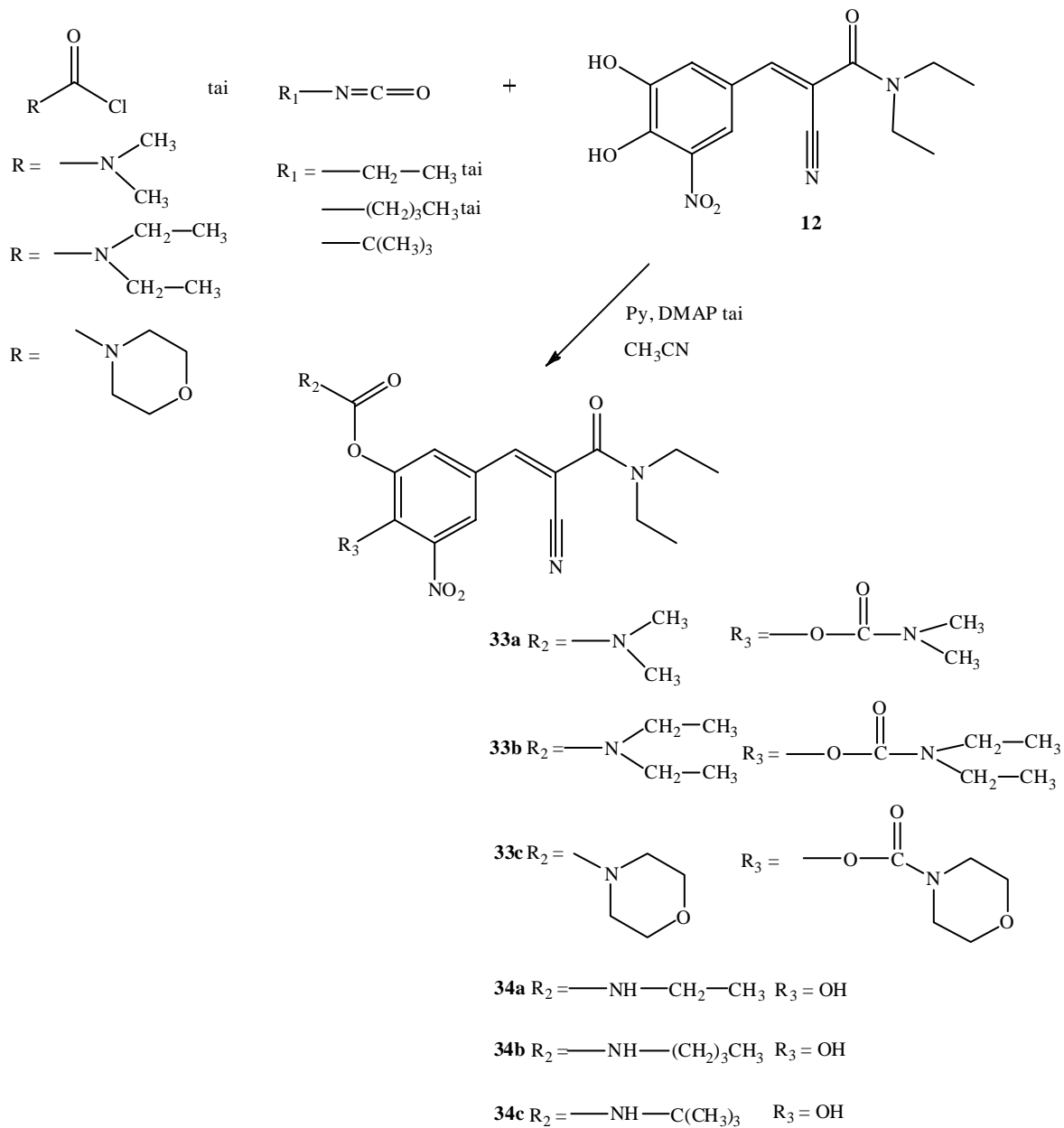
4.1.2.8.1. Entakaponin karbamaattiesterit

Entakaponin (**12**) vesiliukoisuuden parantamiseksi Savolainen *et. al.* syntetisoivat sen *N*-alkyyli- ja *N,N*-dialkyylikarbamaattiestereitä (**33a-c**, **34a-c**) ja arvioivat niitä mahdollisina entakaponin aihiolääkkeinä¹³⁵. Tarkoituksena oli parantaa suun kautta otettavan entakaponin biologista hyötyosuutta lisäämällä sen vesiliukoisuutta happamissa olosuhteissa sekä rasvaliukoisuutta neutraaleissa olosuhteissa.^{11,135}

Syytä entakaponin huonoon biologiseen hyötyosuuteen ei tunneta. Yksi mahdollinen syy voi olla entakaponin runsas alkureitin metabolia (engl. first pass metabolism), jolloin metaboloituminen tapahtuu jo imeytymisaikana ennen pääsyä systeemiverenkiertoon¹³⁶. Entakaponi on heikko happo (pK_a 4,5)¹³⁷, joten ohutsuolessa se on ionisoituneessa muodossa. Tämä vaikeuttaa sen imeytymistä ohutsuolessa. Heikkona happona entakaponin vesiliukoisuus heikkenee pH:n alentuessa, ja tästä johtuen imeytyminen on heikkoa myös mahalaukun erittäin happamissa olosuhteissa. Entakaponin vesiliukoisuus onkin pH-riippuvainen (Taulukko 5, sivu 37).^{11,135}

N,N-dialkylylikarbamaatit (**33a-c**) syntetisoidaan asyloimalla entakaponi (**12**) sopivalla karbamoyylikloridilla (Kaavio 11). *N*-alkyylikarbamaatit (**34a-c**) valmistetaan käyttämällä sopivaa isosyanaattia (Kaavio 11). Savolainen *et. al.* totesivat, että isosyanaattia on käytettävä 3-4 ekvivalenttia reaktion saattamiseksi loppuun. Isosyanaattia käytettäessä lopputuotteena muodostuu ainoastaan monosubstituoituja karbamaatteja. Vaikka isosyanaattia käytettiin näissä kokeiluissa huomattava ylimäärä ja kokeiltiin korkeaa reaktiolämpötilaa, 3,4-di-*O*-karbamoyylisubstituoituja yhdisteitä ei muodostunut. Syynä tähän saattavat olla bentseenirenkaan 5-asemassa olevan suurikokoisen nitroryhmän aiheuttama steerinen este sekä elektroniset tekijät.¹³⁵

Syntetisoidut entakaponin *N,N*-dialkylylikarbamaattiesterit eivät hydrolysoitu ihmisen seerumilla tehdyissä *in vitro* -kokeissa, eikä niille tästä johtuen tehty jatkotutkimuksia. Entakaponin vesiliukoisuutta oli kuitenkin mahdollista parantaa valmistamalla siitä karbamaattiesteriaihiolääkkeitä. Esimerkiksi syntetisoitujen *N*-alkyylikarbamaattiestereiden vesiliukoisuus on korkeampi pH:ssa 7,4 ja kahden rakenteen kohdalla (**34a**, **34c**) vesiliukoisuus on korkeampi myös pH:ssa 5,0 (Taulukko 5, sivu 37). Entakaponin biologista hyötyosuutta ei kuitenkaan onnistuttu parantamaan. Savolainen *et. al.* tutkivat syntetisoitujen karbamaattiesteriaihiolääkkeiden farmakodynaamisia ominaisuuksia rottakokeissa. Niiden ja tehtyjen farmakokineettisten tutkimusten perusteella todettiin, että aihiolääkkeiden farmakodynaamiset ominaisuudet eivät olleet parempia entakaponin vastaaviin verrattuna. Tulosten perusteella ongelmat entakaponin liukoisuudessa ja jakaantumisessa ruoansulatuskanavassa, erityisesti matalissa pH-olosuhteissa, saattavat merkittävästi rajoittaa sen biologista hyötyosuutta.^{135,136}



Kaavio 11. Entakaponin *N,N*-dialkylikarbamaattiestereiden (**33a-c**) ja *N*-alkylikarbamaattiestereiden (**34a-c**) synteesi.

Taulukko 5. Entakaponin (**12**) ja sen *N*-alkyylikarbamaattiestereiden (**34a-c**) vesiliukoisuuksia.¹³⁵

| Yhdiste | Vesiliukoisuus (µg/ml), pH 5,0 ^a | Vesiliukoisuus (µg/ml), pH 7,4 ^a |
|------------|---|---|
| 12 | 77,3 ± 2,3 | 1751,8 ± 119,1 |
| 34a | 248,3 ± 12,8 | ≥ 40000 ^b |
| 34b | 9,0 ± 0,3 | 1943,9 ± 192,8 |
| 34c | 120,2 ± 23,3 | 2457,7 ± 441,0 |

^aKeskiarvo ± keskihajonta, n=3

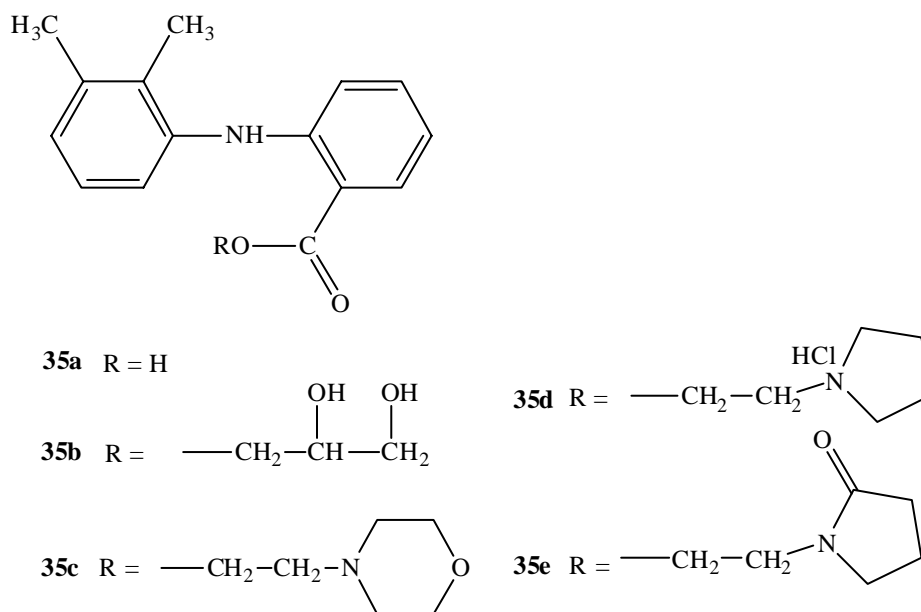
^bYksi mittaus

4.1.2.8.2. Mefenaamihapon esteriaihiolääkkeet

Erityisesti tulehduskipulääkkeiden pitkittynyt käyttö aiheuttaa haittavaikutuksia, mutta niitä voi ilmetä myös lyhytaikaisen käytön seurauksena. Haittavaikutuksia ovat esimerkiksi ruoansulatuskanavan lievä ärsyntyminen ja pahimmassa tapauksessa vakavat haavaumat. Niiden epäillään johtuvan tulehduskipulääkkeiden rakenteessa olevan vapaan karboksyyliiryhmän aiheuttamasta paikallisesta ärsytyksestä sekä toisaalta tulehduskipulääkkeiden aiheuttamasta prostaglandiinien biosynteesin estymisestä, mikä vähentää niiden mahan limakalvoa suojaavaa vaikutusta.^{138,139}

Mefenaamihappo (**35a**) (Kuva 4) on yleisesti käytetty tulehduskipulääke kuumeen ja kivun hoitoon. Wiwattanawongsa *et. al.* syntetisoivat mefenaamihapon esteriaihiolääkkeitä (**35b-e**) tarkoituksena vähentää mefenaamihapon aiheuttamia haittavaikutuksia (Kuva 4)¹³⁹. Useimmat mefenaamihapon esteriaihiolääkkeistä syntetisoidaan yksivaiheisella synteesillä antamalla mefenaamihapon reagoida sopivan alkoholin kanssa.¹³⁹

Wiwattanawongsa *et. al.* vertasivat esteriaihiolääkkeiden vesiliukoisuutta mefenaamihapon vesiliukoisuuteen (0,2 mg/ml)¹⁴⁰. Aihiolääkkeen (**35d**) vesiliukoisuus on noin 5-kertainen mefenaamihappoon verrattuna (pH 5,0). Muiden syntetisoitujen esteriaihiolääkkeiden vesiliukoisuus on mefenaamihappoa huonompi. Aihiolääkkeiden (**35c**) ja (**35d**) vesiliukoisuus riippuu pH:sta. (Taulukko 6)¹³⁹



Kuva 4. Mefenaamihapon (**35a**) ja sen esteriaihiolääkkeiden (**35b-e**) rakenteet.

Taulukko 6. Mefenaamihapon (**35a**) ja sen esteriaihiolääkkeiden (**35b-e**) vesiliukoisuuksia¹³⁹.

| Yhdiste | Vesiliukoisuus (µg/ml) |
|------------|-----------------------------------|
| 35a | 200 |
| 35b | 6,0 |
| 35c | 2,6 (pH 7,4) 6,2 (pH 5,0) |
| 35d | 109,3 (pH 7,4) 1045,6 (pH 5,0) |
| 35e | 2,6 |

4.1.2.8.3. TAK-456:n esteriaihiolääkkeet

TAK-456:lla (1-[(1*R*,2*R*)-2-(2,4-difluorifenyyli)-2-hydroksi-1-metyyli-2-(1*H*-1,2,4-triaatsol-1-yyli)propyyli]-3-[4-(1*H*-1-tetratsolyyli)fenyyli]-2-imidatsolidinoni) (**36**) on eräiden sienten kasvua ehkäisevä vaikutus. Sen vesiliukoisuus on huono (5 µg/ml). Ichikawa *et. al.* syntetisoivat useita sen esteriaihiolääkkeitä tarkoituksena parantaa lääkeaineen vesiliukoisuutta ja valmistaa siitä injektio- ja suun kautta otettavien valmisteiden systeemisten sieni-infektioiden hoitoon (Kaavio 12)¹⁴¹. Esteriaihiolääkkeet syntetisoidaan alkyloimalla

TAK-456 halometyyliesterillä tai halometyylikarbonaatilla. Aihio-osa liitetään triatsolirenkaan typpiin. Mikäli toisena lähtöaineena on bromia tai klooria sisältävä rakenne, tehdään anioninvaihto käyttämällä esimerkiksi Dowex-hartsia. Esteriaihiolääkkeet suunniteltiin siten, että esterisidos hajoaa entsyymaattisesti, jonka jälkeen formaldehydi ja varsinainen lääkeaine vapautuvat spontaanisti.^{107,141}

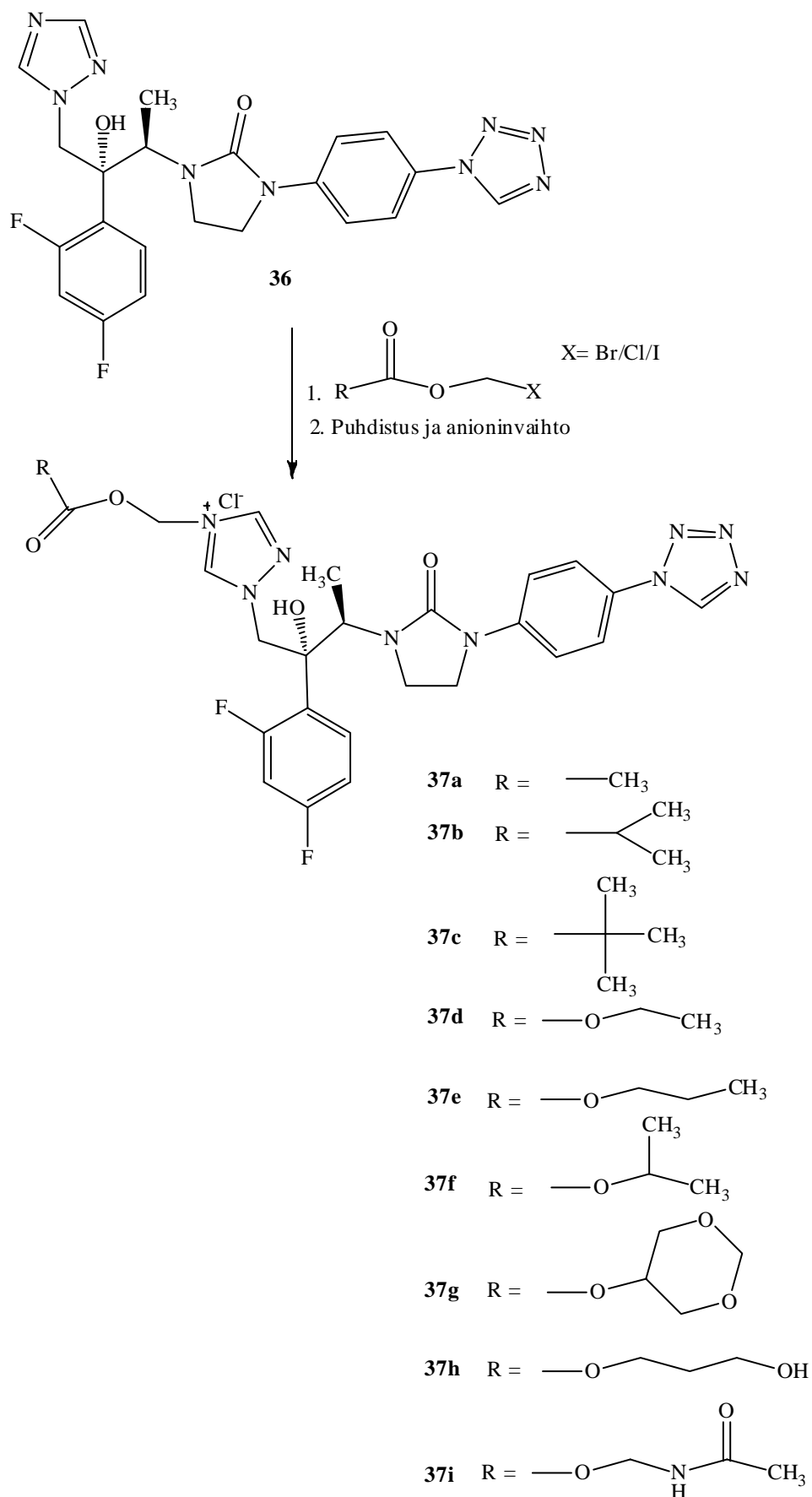
Kaikkien syntetisoitujen esteriaihiolääkkeiden vesiliukoisuus on merkittävästi TAK-456:n arvoa parempi (Taulukko 7). Vesiliukoisimpia ovat polaarisen hydroksyyli- ja asetamidoryhmän sisältävät aihiolääkkeet (**37h**, **37i**). Yksi aihiolääkkeistä (**37a**) valittiin tarkempiin jatkotutkimuksiin, koska se osoittautui riittävän vesiliukoiseksi ja pysyväksi injektio-annosteluun. Eläinkokeiden ja ihmisen plasmalla tehtyjen in vitro -kokeiden perusteella sen todettiin metaboloituvan nopeasti varsinaiseksi lääkeaineeksi. Lisäksi sillä havaittiin eläinkokeissa potentiaalisia terapeuttisia vaikutuksia eräitä sieni-infektioiden aiheuttajia vastaan.¹⁴¹

Taulukko 7. TAK-456:n (**36**) ja sen esteriaihiolääkkeiden (**37a-i**) vesiliukoisuuksia.¹⁴¹

| Yhdiste | Vesiliukoisuus (mg/ml), glukoosiliuos (5 %) |
|------------|---|
| 36 | 0,005 |
| 37a | 4 ^a , 10 ^b |
| 37b | 3 |
| 37c | 6 |
| 37d | 3 |
| 37e | 1,5 |
| 37f | 2 |
| 37g | 5-8 |
| 37h | > 10 |
| 37i | > 10 |

^aHydratoitunut muoto

^bEi-hydratoitunut muoto

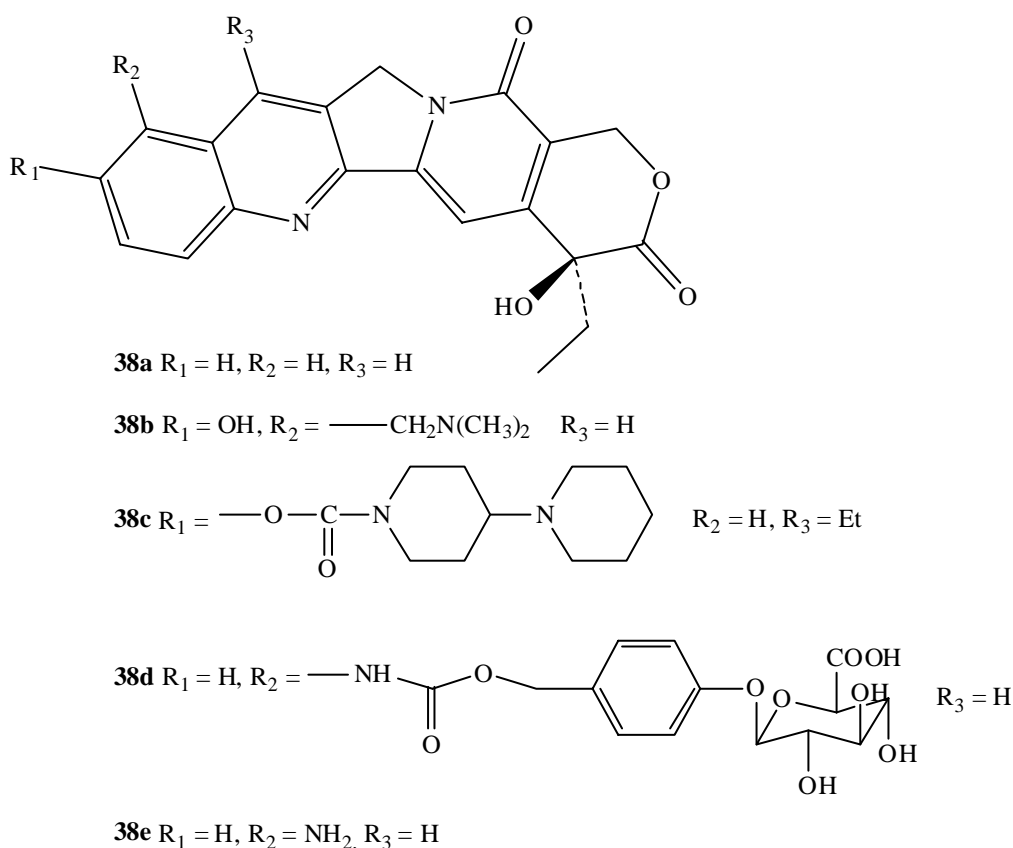


Kaavio 12. TAK-456:n (**36**) rakenne ja sen esteriaihiolääkkeiden (**37a-i**) synteesi.

4.1.2.9. Sokerijohdannaiset

4.1.2.9.1. Kamptotesiinin glukuronidijohdannainen

20(*S*)-kamptotesiini (**38a**) (Kuva 5) on syöpälääkkeenä käytettävä alkaloidi, jonka vesiliukoisuus on huono. Kamptotesiinista on syntetisoitu useita johdannaisia, joiden tarkoituksena on ollut parantaa sen vesiliukoisuutta ja vähentää toksisuutta. Kliinisessä käytössä on kaksi vesiliukoista johdannaista, topotekaani (**38b**) ja irinotekaani (**38c**) (Kuva 5).¹⁴²



Kuva 5. 20(*S*)-kamptotesiinin (**38a**), sen johdannaisten (**38b-c**) ja aihiolääkkeen (**38d**) sekä 9-aminokamptotesiinin (**38e**) rakenteet.

Leu *et. al.* syntetisoivat *N*-[9-(β -*D*-glukuronyyli)bentsyylioksikarbonyyli]-aminokamptotesiinin (**38d**) 20(*S*)-kamptotesiinin vesiliukoiseksi aihiolääkkeeksi¹⁴². Siinä 9-aminokamptotesiini (**38e**) ja glukuronidihappo ovat liittyneet yhteen karbamaattilinkkerin välityksellä. Ensin valmistetaan 9-aminokamptotesiini, jonka annetaan reagoida nitrofenyyliklooriformaatin kanssa. Tällöin muodostuu välituote (**39**) (Kaavio 13, sivu 43).¹⁴²

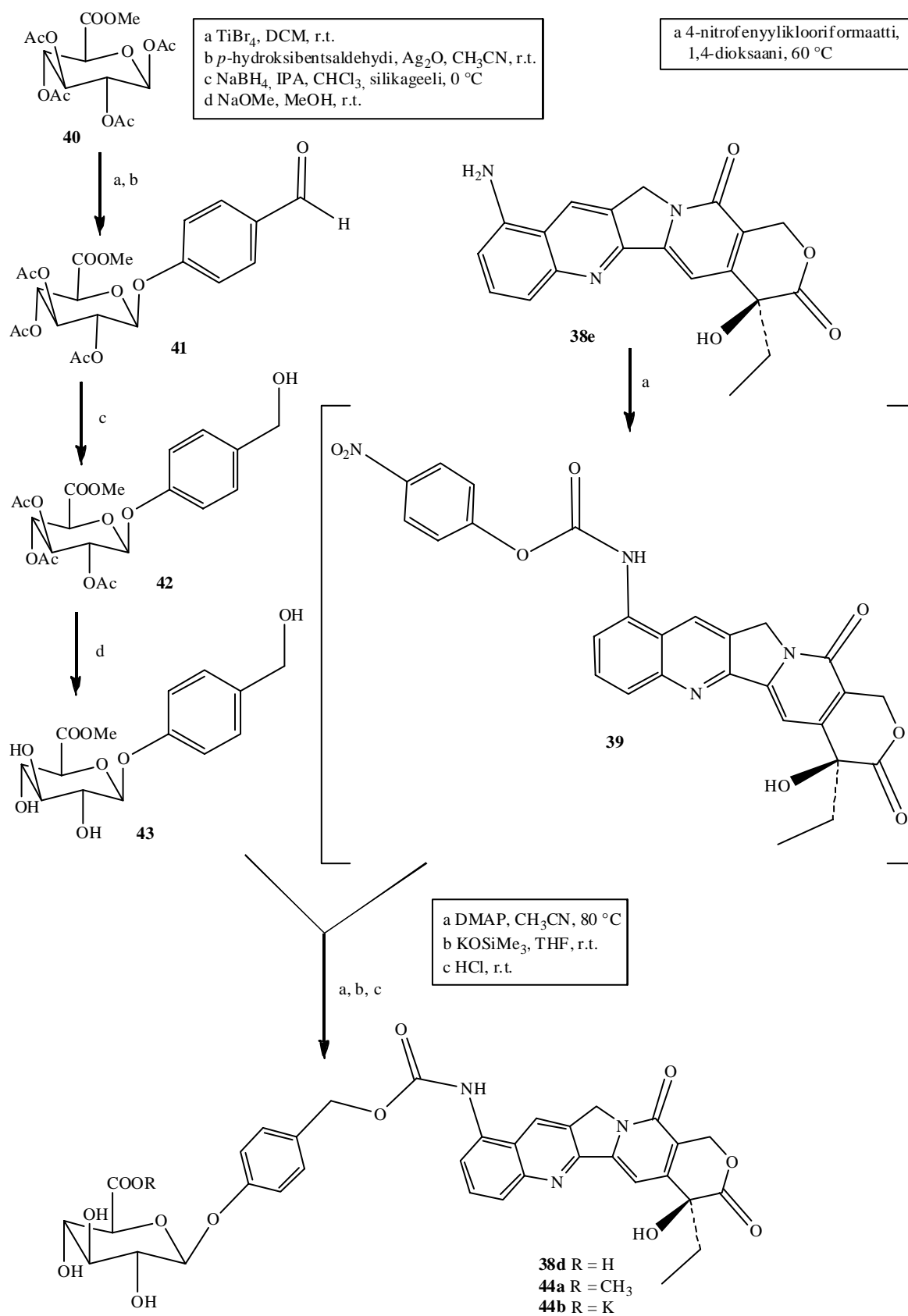
Metyyli-1,2,3,4-tetra-*O*-asetyyli- β -*D*-glukuronaatti (**40**) halogenoidaan titaani-tetrabromidilla. Tämän jälkeen sen annetaan reagoida *p*-hydroksibentsaldehydin kanssa hopea(I)oksidin (Ag₂O) läsnä ollessa. Tällöin muodostuu metyyli-1-(4-formyylifenyyl)-2,3,4-tri-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranuronaatti (**41**). Siinä oleva aldehydyryhmä pelkistetään primaarisiksi hydroksyyli-ryhmäksi käsittelemällä yhdistettä (**41**) natriumboorihydridillä (NaBH₄). Muodostuneesta metyyli-1-(4-hydroksimetyylifenyyli)-2,3,4-tri-*O*-asetyyli- β -*D*-glukopyranuronaatista (**42**) poistetaan suojaryhmät käyttämällä natriummetoksidia (NaOMe) metanolissa (MeOH), jolloin muodostuu metyyli-1-(4-hydroksimetyylifenyyli)- β -*D*-glukopyranuronaatti (**43**) (Kaavio 13).¹⁴²

Yhdisteiden (**43**) ja (**39**) annetaan reagoida lämpötilassa 80 °C, jolloin muodostuu metyyli-*N*-[9-(β -*D*-glukuronyyli)bentsyylioksikarbonyyli]aminokamptotesiini (**44a**). Siitä poistetaan suojaryhmä käyttämällä kaliumtrimetyylisilanaattia (1 ekv.) THF:ssä. Tämän jälkeen muodostuu kalium-*N*-[9-(β -*D*-glukuronyyli)bentsyylioksikarbonyyli]aminokamptotesiini (**44b**). Kun sitä käsitellään HCl:lla, lopputuotteena muodostuu 20(*S*)-kamptotesiinin vesiliukoinen aihiolääke (**38d**) (Kaavio 13).¹⁴²

9-Aminokamptotesiinin (**38e**) vesiliukoisuus on huono erityisesti happamissa olosuhteissa (Taulukko 8). Siihen verrattuna 20(*S*)-kamptotesiinin aihiolääkkeen (**38d**) vesiliukoisuus on noin 80-kertainen pH:ssa 4,0 ja noin 1800-kertainen pH:ssa 7,0. Tällainen arvo tarkoittaa, ettei aihiolääke ei saostu elimistössä suonensisäisen annostelun jälkeen. Aihiolääke suolamuodossa (**44b**) on erittäin vesiliukoinen myös pH:ssa 4,0 (Taulukko 8). Tulosten perusteella yhdistettä (**38d**) voidaan pitää potentiaalisena syövän hoitoon käytettävänä 20(*S*)-kamptotesiinin aihiolääkkeenä.¹⁴²

Taulukko 8. 20(*S*)-kamptotesiinin aihiolääkkeen (**38d**), 9-aminokamptotesiinin (**38e**), ja 20(*S*)-kamptotesiinin kaliumsuolan (**44b**) vesiliukoisuudet.⁶⁸

| Yhdiste | Vesiliukoisuus (mg/ml), pH 4,0 | Vesiliukoisuus (mg/ml), pH 7,0 |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 38d | 0,5 | 110 |
| 38e | 0,006 | 0,06 |
| 44b | 25 | ei määritetty |

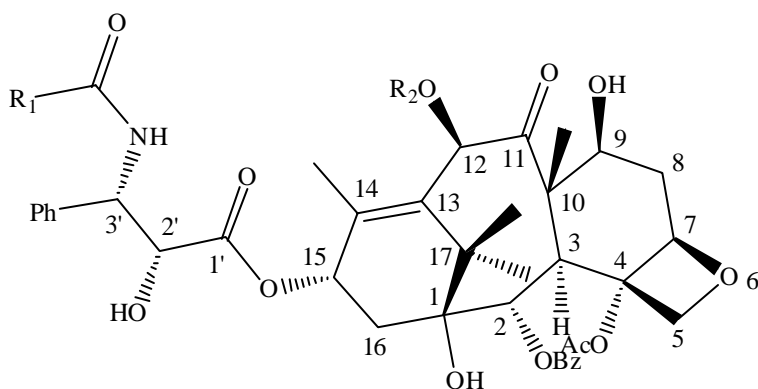


Kaavio 13. 20(*S*)-kamptotesiinin ahiolääkkeen (**38d**) synteesi.

4.1.2.9.2. Paklitakselin aihiolääkkeet – β -glukuronidin liittäminen

paklitakseliin

Paklitakseli ($2\alpha,4\alpha,5\beta,7\beta,10\beta,13\alpha$)-4,10-bis(asetyloksi)-13-[[$(2R,3S)$ -3-(bentsoyyliamino)-2-hydroksi-3-fenyylipropanoyyli]oksi]-1,7-dihydroksi-9-okso-5,20-epoksitaks-11-en-2-yylibentsoaatti) (**45a**) on diterpeenirakenteinen yhdiste (Kuva 6). Se kykenee estämään solun tukirankaa muodostamassa olevien mikrotubulusten (mikroputket) toimintaa kasvainsoluissa. Tämän vuoksi sitä käytetään lääkkeenä syövän hoidossa, ja se hyväksyttiin alun perin lääkkeeksi munasarjasyövän ja rintasyövän hoitoon. Paklitakseliä käytetään myös useiden muiden syöpien hoidossa¹⁴³. Käyttöä rajoittaa kuitenkin sen huono vesiliukoisuus ($0,4 \mu\text{g/ml}$)^{144,145}. Kirjallisuudessa paklitakselin vesiliukoisuudelle on esitetty myös muita arvoja kuten alle $0,005 \mu\text{mol/dm}^3$ ¹⁴⁶ ja $0,6 \text{mmol/dm}^3$ ¹⁴⁷. Vesiliukoisuutta rajoittavat rakenteen hydrofobisuus ja sivuketju^{144,148}. Paklitakselin analogin doketakselin (**45b**) (Kuva 6), jota käytetään myös syövän hoidossa, vesiliukoisuus on $14 \mu\text{g/ml}$.¹⁴⁴



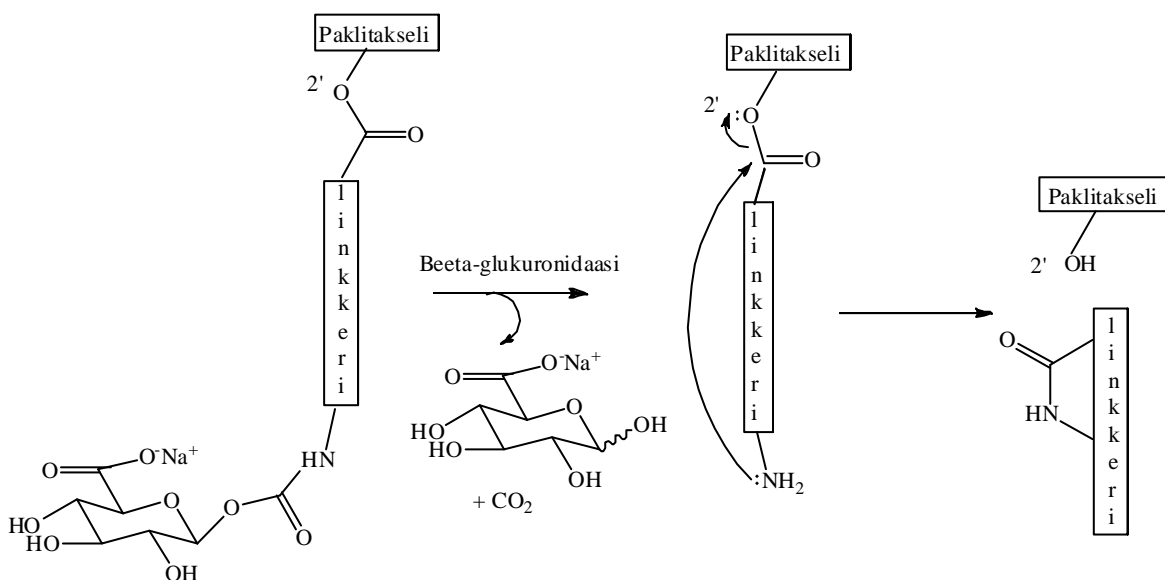
45a $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ac}$

45b $R_1 = \text{O}^t\text{Bu}$, $R_2 = \text{H}$

Kuva 6. Paklitakselin (**45a**) ja doketakselin (**45b**) rakenteet.

Leenders *et al.* syntetisoivat paklitakselin aihiolääkkeitä, joissa β -glukuronidi liitetään paklitakseliin linkkerin välityksellä¹⁴⁹. Polaarisen sokerimolekyylin liittäminen paklitakseliin aihio-osana lisää vesiliukoisuutta. Linkkerin ja β -glukuronidin välillä on karbamaattisidos, ja linkkeri liittyy esterisidoksella paklitakselin 2'-hydroksyyliinryhmään. Kyseinen ryhmä on välttämätön paklitakselin sytotoksiselle aktiivisuudelle, joten aihiolääkkeen toksisuus vähenee funktionalisoimalla kyseinen ryhmä. Linkkerin käyttö

saattaa helpottaa β -glukuronidaasin katalysoimaa hydrolyysiä. Karbamaattisidoksen katkeamisen ja sitä seuraavan hiilidioksidin vapautumisen jälkeen linkkerin vapaa aminoryhmä hyökkää esterisidokseen, jolloin paklitakseli vapautuu (Kaavio 14).^{146,149}



Kaavio 14. Paklitakselin vapautuminen hydrolyysin seurauksena.

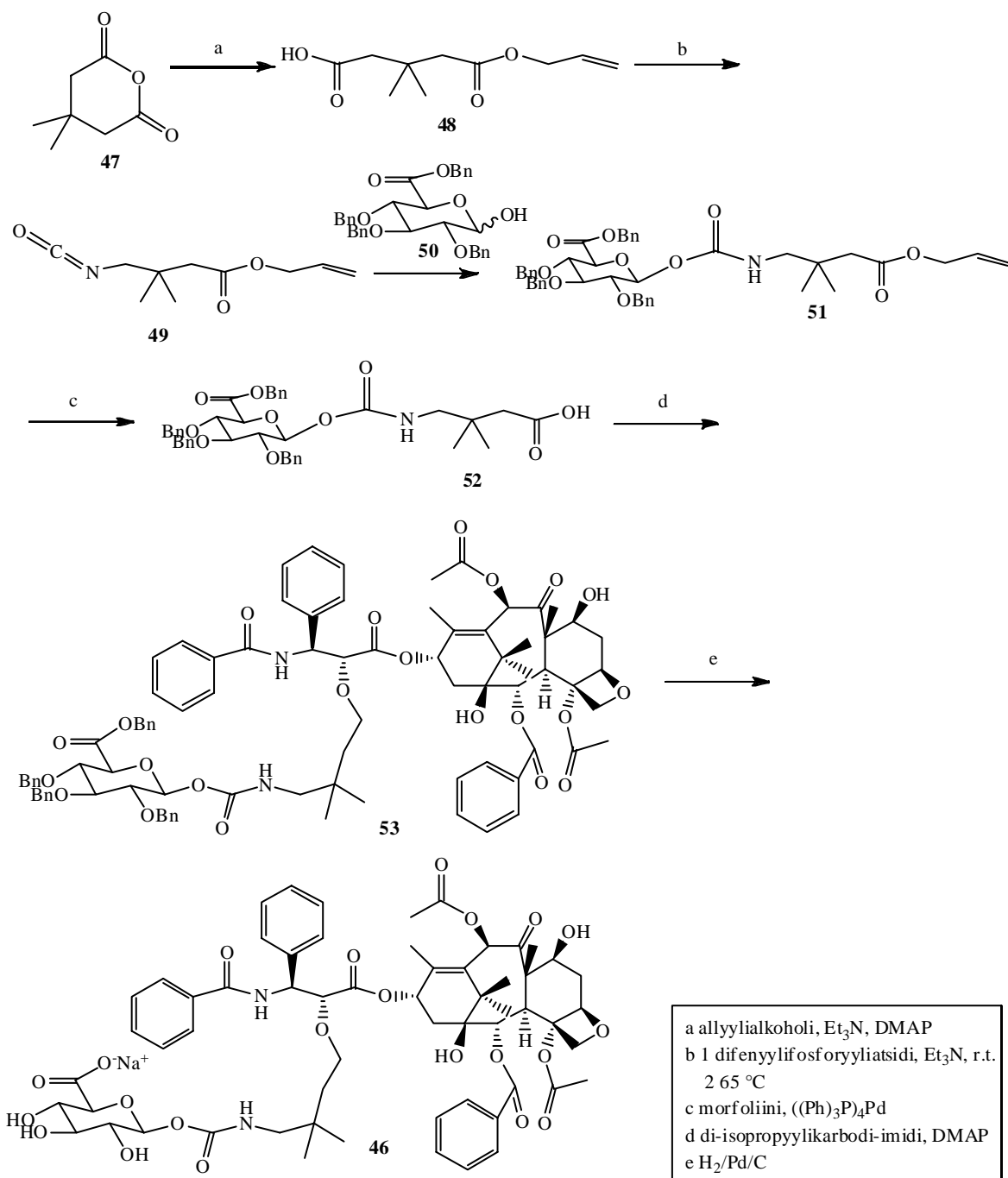
Kaaviossa 15 (sivu 47) on esitetty esimerkkinä paklitakselin aihiolääkkeen (**46**) synteesi. Muut aihiolääkkeet valmistetaan vastaavalla tavalla käyttämällä sopivaa syklistä lähtöainetta. Synteesissä β -glukuronihapon johdannainen liitetään isosyanaattiryhmän sisältävään linkkeriin. Linkkerirakenne liitetään paklitakselin 2'-hydroksyyli-ryhmään. Suojaryhmien poiston jälkeen lopputuotteena saadaan paklitakselin aihiolääke (**46**). Synteesissä avataan ensin anhydridin (**47**) rengasrakenne käyttämällä allyylialkoholia, 4-*N,N*-dimetyyliaminopyridiiniä (DMAP) ja DCC:iä. Välituotteena muodostuu karboksyylihappo (**48**) (Kaavio 15).¹⁴⁶

Synteesin onnistumisen kannalta tärkeä vaihe on isosyanaatin (**49**) valmistaminen. Se syntetisoidaan karboksyylihapposta (**48**) Curtiuksen toisiintumisella. Siinä karboksyylihapposta muodostuu ensin vastaava asyyliatsidi käyttämällä difenyylifosforyyliatsidia ja TEA:a. Lämmittäminen saa aikaan isosyanaatin muodostumisen. Synteesin seuraavassa vaiheessa isosyanaattiin liitetään 1-hydroksi-2,3,4,6-tetrabentsyyli- β -glukuronihappo (**50**), jolloin saadaan suojattu karbamaatti (**51**). Allyylisuojaryhmän poiston jälkeen muodostuu karboksyylihappo (**52**), joka liitetään paklitakseliin. Tällöin saadaan paklitakselin suojattu aihiolääke (**53**). Reaktiossa käytetään *N,N'*-di-isopropylikarbodi-imidiä DCC:n sijasta, sillä DCC:n käyttäminen aiheuttaa

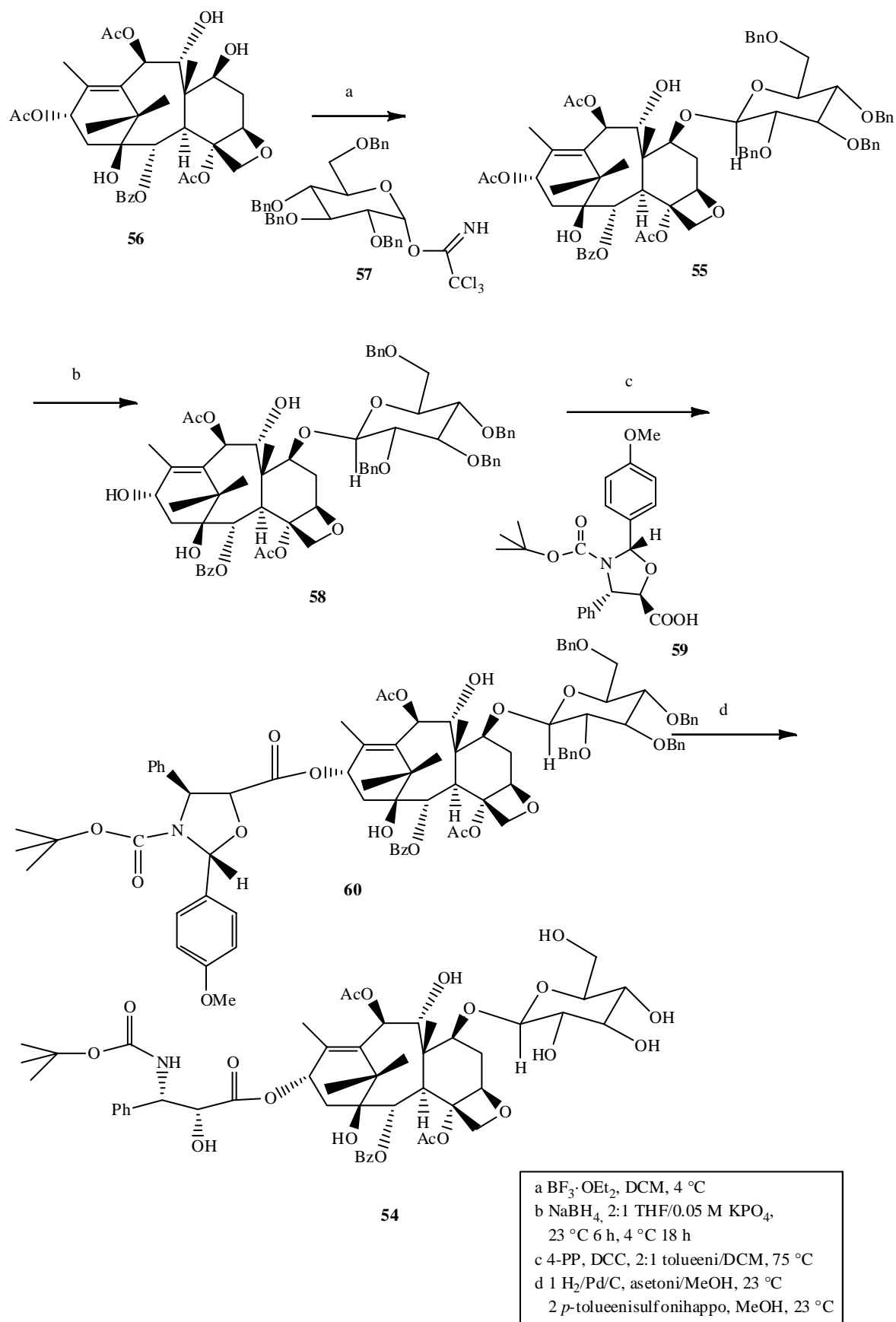
disykloheksyyliurean (DCU) muodostumista. Tämä vaikeuttaa tuotteiden silikageelipuhdistusta. Paklitakselin aihiolääke (**46**) saadaan poistamalla bentsyyლისuojaryhmät käyttämällä palladiumaktivoitua hiiltä ja tekemällä ioninvaihto (Kaavio 15). Aihiolääkkeet metaboloituvat entsyymaattisella hydrolyysillä, jolloin paklitakseli vapautuu. Syntetisoidut aihiolääkkeet ovat paklitakselia vesiliukoisempia. Aihiolääkkeiden vesiliukoisuudeksi on esitetty 10 mmol/dm³ tai yli.¹⁴⁶ Tämä on selvästi suurempi kuin paklitakselin vesiliukoisuus, vaikka sen vesiliukoisuuden arvo kirjallisuuden mukaan vaihtelee, kuten yllä on esitetty.

4.1.2.9.3. O-glykosyloitu taksaani

Taksaaniglykokonjugaatteja esiintyy luonnossa, ja niillä on syöpäkasvaimia tuhoava vaikutus. Nikolakakis *et. al.* syntetisoivat *O*-glykosyloidun taksaanin (7-(β -*D*-glukopyranosyylioksi)-9-dihydro-10-asetyylidoketakseli) (**54**) (Kaavio 16, sivu 48)¹⁴⁸. *O*-glykosidi (**55**) syntetisoidaan käyttämällä lähtöaineina 9-dihydro-13-asetyylibakkatiini III:a (**56**) ja bentsyloitua α -*D*-glukopyranosyyli-1,3-dikloriasetimidaattia (**57**), joka toimi glykosyylidonorina. Katalyyttinä käytetään Lewisin happoa. Yhdisteen (**55**) C-13:ssa oleva asetyyლისuojaryhmä poistetaan käsittelemällä yhdistettä (**55**) THF:n ja kaliumfosfaatin seoksessa (pH 7,0) NaBH₄:llä¹⁵⁰. Tällöin saadaan väliaine (**58**). Sen C-13:ssa oleva vapaa hydroksyyli-ryhmä esteröidään käyttämällä *N*-Boc-fenyli-isoseriinin 2-(4-metoksi)fenyyli-1,3-oksatsolidiinia (**59**), DCC:iä ja 4-pyrrolidiinopyridiiniä (4-PP). Muodostuneen β -*D*-glukopyranosyylin (**60**) bentsyyლისuojaryhmät poistetaan käyttämällä palladiumaktivoitua hiiltä. Sivuketjun suojarhmä poistetaan katalyyttisellä määrällä *p*-tolueenisulfonihappoa MeOH:ssa. Synteesin lopputuotteena muodostuu *O*-glykosyloitu taksaani (**54**). Se on potentiaalinen lääkeainekandidaatti, sillä sokerosan liittäminen rakenteeseen lisää sen vesiliukoisuuden kaksinkertaiseksi paklitakseliin (**45a**) verrattuna.¹⁴⁸



Kaavio 15. Pakselitaksin aihiolääkkeen (46) synteysi.



Kaavio 16. *O*-glykosyloidun taksaanin (**54**) synteesi.

4.1.2.10. Polyetyleeniglykolit

PEG:t ovat lineaarisia tai haarautuneita varauksettomia etyleenioksidin oligo- tai polymeerejä. PEG:t syntetisoidaan polymerisoimalla etyleenioksidia veden läsnä ollessa. Reaktion aluksi tapahtuu hydroksidi-ionin nukleofiilinen hyökkäys epoksidirenkaaseen. Mikäli reaktiossa käytetään esimerkiksi MeOH:ia tai sen johdannaisia, saadaan monoalkyyli-ryhmän sisältäviä PEG:ja, esimerkiksi metoksi-PEG. Polymerisaatiota voidaan kontrolloida, ja syntetisoitujen PEG:ien molekyyli-paino voikin vaihdella. Molekyyli-painoltaan pienimmät PEG:t ovat viskooseja, värittömiä ja olomuodoltaan nestemäisiä. Molekyyli-painon kasvaessa PEG:t muuttuvat vahamaisiksi, valkoisiksi ja olomuodoltaan kiinteiksi. Kiinteiden PEG:ien sulamispiste on verrannollinen niiden molekyyli-painoon. PEG:t ovat amfi-fiilisiä eli niiden rakenteessa on sekä hydrofiilinen että hydrofobinen osa. Ne liukenevatkin sekä veteen että moniin orgaanisiin liuottimiin.^{11,78,151-153}

PEG:t eivät ole toksisia. Ne metaboloituvat elimistössä maksassa ja erittyvät nopeasti munuaisten kautta. Nämä ominaisuudet, yhdessä PEG:ien vesiliukoisuuden kanssa, mahdollistavat niiden käytön farmaseuttisiin tarkoituksiin. PEG:t onkin hyväksytty annosteltavaksi ihmisille suonensisäisesti sekä suun tai ihon kautta¹⁵⁴. PEG:ja voidaan käyttää aihio-osana valmistettaessa aihiolääkkeitä, joiden tarkoituksena on parantaa lääkeaineen vesiliukoisuutta tai pääsyä elimistöön. Lääkeaine on usein jokin syövän hoitoon kehitetty, kuten paklitakseli, metotreksaatti tai sisplatiini. PEG liittyy lääkeaineeseen kovalenttisesti linkkerin välityksellä esimerkiksi esteri- tai amidisidoksella, joka hajoaa elimistössä entsyymaattisesti tai kemiallisesti^{78,153}. Aihiolääkkeen muuttuminen varsinaiseksi lääkeaineeksi voi lisäksi tapahtua 1,6-eliminaation¹⁵⁵ tai trimetyylilaktonisaation¹⁵⁶ kautta.¹⁵²

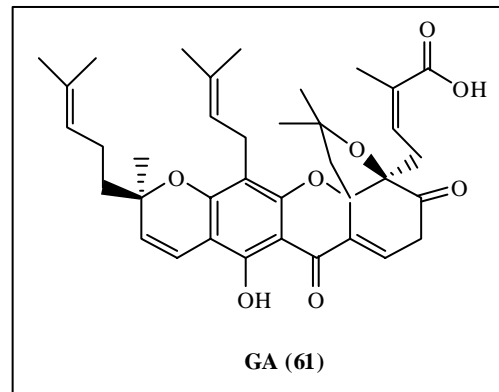
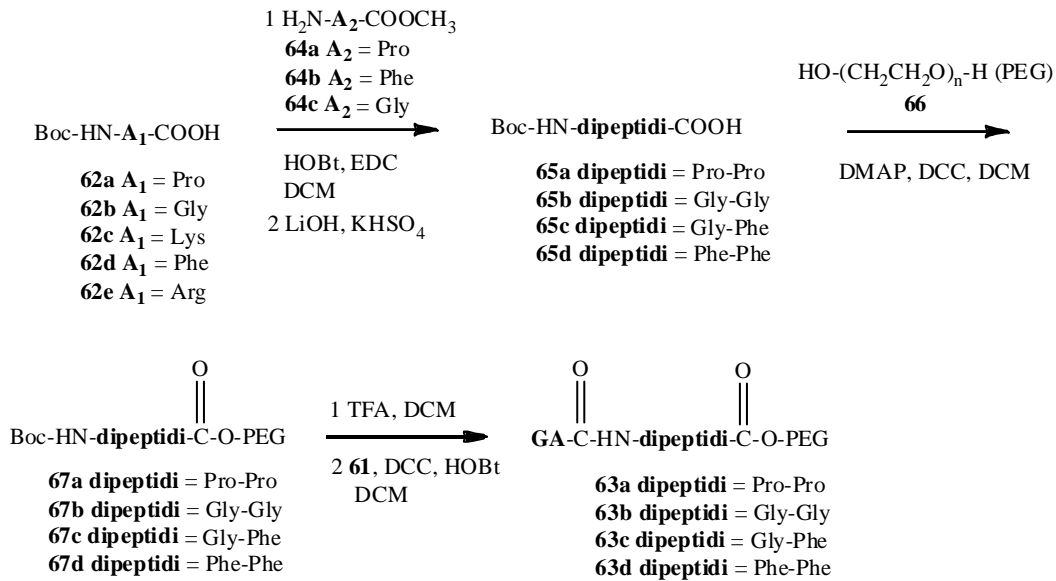
Onnistunut konjugoituminen biomolekyylien kanssa riippuu biomolekyylin koosta, kemiallisesta rakenteesta, rakenteessa mahdollisesti olevista steerisistä esteistä sekä biomolekyylin ja PEG:n reaktiivisuudesta. Molempien kemiallisessa rakenteessa on oltava sopiva funktionaalinen ryhmä, kuten karboksyyli-, hydroksyyli-, tioli- tai aminoryhmä.^{11,152}

4.1.2.10.1. Gambogiinihapon PEG-aihiolääkkeet

Gambogiinihappo (engl. gambogic acid, GA) (**61**) (Kaavio 17) aiheuttaa syöpäsolujen apoptoosia (solukuolema)¹⁵⁷. Gambogiinihapon vesiliukoisuus on huono (alle 0,5 µg/ml), mikä vaikeuttaa sen käyttöä lääkeaineena. Ding *et. al.* syntetisoivat gambogiinihapon johdannaisia parantaakseen sen vesiliukoisuutta ja farmakokineettisiä ominaisuuksia¹⁵⁸. Osassa valmistetuista PEG-konjugaateista linkkerinä käytettiin erilaisia aminohappoja ja dipeptidejä. Syntetisoiduista PEG-konjugaateista tarkasteltiin muun muassa niiden jakaantumista elimistössä sekä farmakokinetiikkaa ja sytotoksisuutta.¹⁵⁸

PEG-GA-konjugaattien synteesi on esitetty ohessa (Kaavio 17). Lähtöaineena käytetään *N-tert*-butoksikarbonyyliamiinohappoja (**62a-e**). Esimerkiksi PEG_{2kDa}-pro-pro-GA-konjugaatin (**63**) monivaiheisessa synteesissä yhdisteet (**62a**) ja (**64a**) liitetään toisiinsa käyttämällä kytkentäreagenssina *N*-(3-dimetyyliaminopropyli)-*N'*-etylikarbodiimidihydrokloridia (EDC). Väli tuotteena saadaan *N-tert*-butoksikarbonyyli-prolyyli-proliini (Boc-pro-pro-COOH) (**65a**).¹⁵⁸

PEG:n (**66**) ja edellä syntetisoidun Boc-pro-pro-COOH:n (**65a**) annetaan reagoida keskenään, jolloin muodostuu Boc-pro-pro-PEG_{2kDa} (**67a**). Se käytetään puhdistamattomana jatkoreaktiossa. Suojaryhmä poistetaan ja näin saadun yhdisteen annetaan reagoida gambogiinihapon (**61**) kanssa, jolloin saadaan PEG_{2kDa}-pro-pro-GA-konjugaatti (**63a**). PEG_{2kDa}-GA-esterit, joiden rakenteessa ei ole linkkeriä, valmistetaan käyttämällä PEG_{2kDa}:ia (1 ekv.) ja gambogiinihappoa (2 ekv.). Samaa menetelmää voidaan käyttää myös syntetisoitaessa PEG_{10kDa}-GA- ja PEG_{20kDa}-GA-esterit.¹⁵⁸



Kaavio 17. PEG_{2kDa}-pro-pro-GA-konjugaatin (**63a**) sekä vastaavien rakenteiden (**63b-d**) synteesi.

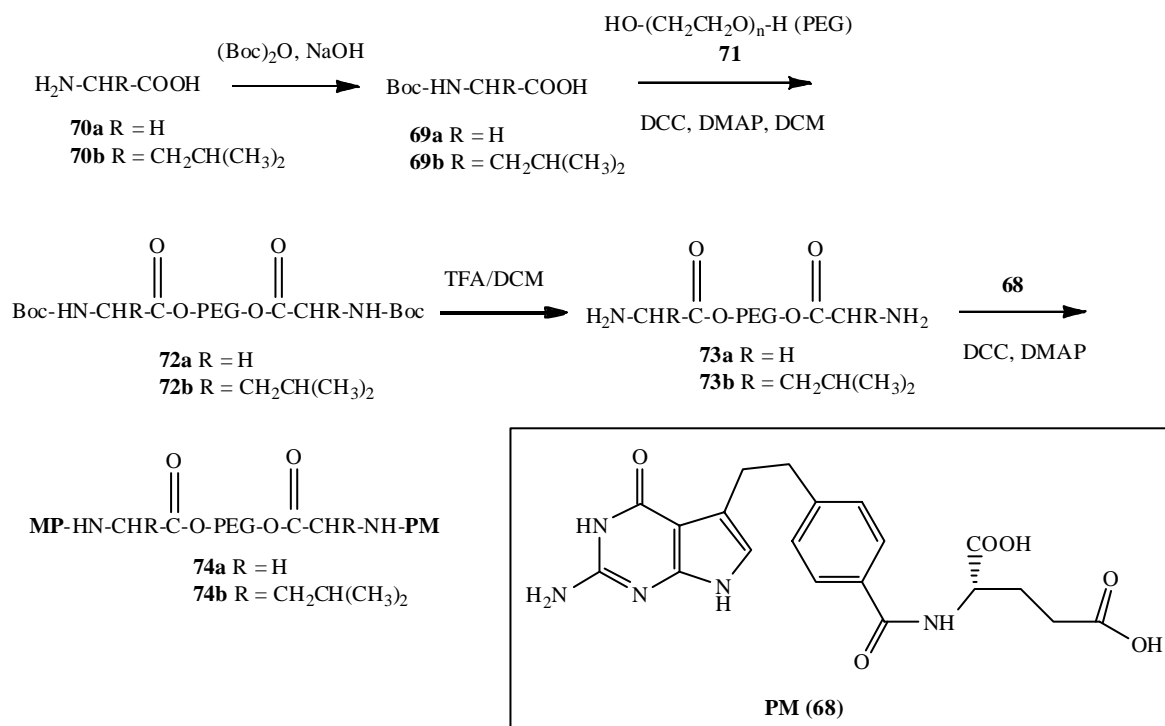
Kaikki Dingin *et. al.* syntetisoimat gambogiinihapon PEG-konjugaatit osoittautuivat gambogiinihappoa vesiliukoisemmiksi. Vesiliukoisuus kuitenkin vaihtelee, ja esimerkiksi PEG_{20kDa}-GA:n vesiliukoisuus on 0,61 mg/ml, mutta PEG_{2kDa}-Gly-GA:n vesiliukoisuus 225,6 mg/ml. Käytetyn polymeerin molekyylipainolla ja linkkerin valinnalla on tärkeä merkitys valmistettujen gambogiinihapon aihiolääkkeiden vesiliukoisuuteen ja lisäksi varsinaisen lääkeaineen vapautumiseen aihiolääkkeestä. PEG:n liittäminen gambogiinihappoon parantaa vesiliukoisuuden lisäksi gambogiinihapon biologista hyötyosuutta. Tulosten perusteella Ding *et. al.* totesivat, että polymeerien liittäminen potentiaalisiin lääkeaineisiin saattaa vähentää huonoon vesiliukoisuuteen liittyviä ongelmia. Lisäksi voidaan edesauttaa lääkeaineiden pääsyä elimistöön.¹⁵⁸

4.1.2.10.2. Pemetreksenin PEG-aihiolääkkeet

Pemetrekseni (*N*-{4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oksi-3*H*-pyrrolo[2,3-*D*]-pyrimidiini-5-yyli)etyyli]bentsoli}-*L*-glutamiinihappo, PM) (**68**) (Kaavio 18) on kemialliselta rakenteeltaan foolihapon eli folaatin johdannainen. Se on antifolaatti eli estää tiettyjen foolihaposta riippuvaisten entsyymien toimintaa. Pemetrekseniä käytetään pahanlaatuisen keuhkopussin mesotelioman hoidossa yhdessä sisplatiinin kanssa sekä ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoidossa^{159,160}. Vapaana happona pemetreksenin vesiliukoisuus on huono. Vesiliukoisuutta voidaan parantaa tekemällä siitä suola. Tällainen menettely ratkaisee kuitenkin vain osan ongelmista ja saattaa aiheuttaa niitä myös lisää. Esimerkiksi pemetreksenin annostelu natriumsuolana voi aiheuttaa natriumionien kertymistä elimistöön ylimäärin. Tämä nostaa verenpainetta ja saattaa aiheuttaa ongelmia potilaille, joilla on ennestään korkea verenpaine.¹⁵⁴

Min *et. al.* syntetisoivat pemetreksenin polyetyleeniglykoliaihiolääkkeitä (Kaavio 18)¹⁵⁴. Synteesin ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan *N*-*tert*-butoksikarbonyyliaminohappoja käyttämällä kirjallisuusmenetelmää¹⁶¹. Esimerkiksi *N*-*tert*-butoksikarbonyyliglysiini (Boc-Gly) (**69a**) valmistetaan liuottamalla glysiini (**70a**) natriumhydroksidia (NaOH) ja *tert*-butyylialkoholia sisältävään seokseen. *N*-*tert*-butoksikarbonyylileusiini (Boc-Leu) (**69b**) syntetisoidaan vastaavalla tavalla käyttämällä aminohappona leusiinia (**70b**).¹⁵⁴

Synteesin toisessa vaiheessa Min *et. al.* valmistivat PEG-aminohappojohdannaisia kirjallisuusmenetelmää mukaillen¹⁶². PEG₂₀₀₀₀:n (**71**) ja Boc-Gly:n (**69a**) annetaan reagoida vuorokauden ajan. Tämän jälkeen liukenemattomat sivutuotteet poistetaan ja suojatusta välituotteesta (**72a**) poistetaan suojaryhmät. Suojaryhmien poiston jälkeen seoksen pH säädetään lievästi emäksiseksi NaOH:lla. Lopputuotteena muodostuu PEG₂₀₀₀₀-glysiini (PEG₂₀₀₀₀-Gly) (**73a**). Vastaavalla tavalla voidaan valmistaa PEG₄₀₀₀-leusiini (PEG₄₀₀₀-Leu) (**73b**). Tällöin aminohappona käytetään leusiinia (**70b**) ja suojattuna välituotteena muodostuu yhdiste (**72b**).¹⁵⁴



Kaavio 18. Pemetreksenin polyetyleeniglykoliaihiolääkkeiden (**74a-b**) synteesi.

Synteesin kolmannessa vaiheessa pemetrekseni (**68**) ja edellä syntetisoitu PEG₂₀₀₀₀-Gly (**73a**) reagoivat PEG₂₀₀₀₀-glysiini-pemetrekseniksi (PEG₂₀₀₀₀-Gly-PM) (**74a**). PEG₄₀₀₀-leusiini-pemetrekseniä (PEG₄₀₀₀-Leu-PM) (**74b**) valmistettaessa käytetään PEG₄₀₀₀-Leu:ia (**73b**). Syntetisoitujen pemetreksenin aihiolääkkeiden, PEG₂₀₀₀₀-Gly-PM ja PEG₄₀₀₀-Leu-PM, vesiliukoisuudet ovat 125 mg/ml ja 650 mg/ml. Käytetyn PEG:n molekyylipaino vaikuttaa merkittävästi valmistetun aihiolääkkeen vesiliukoisuuteen, ja aihiolääkkeen vesiliukoisuus onkin hyvin lähellä käytetyn PEG:n vesiliukoisuutta.¹⁵⁴

Bioaktiivisten yhdisteiden liittäminen PEG:iin tapahtuu pääasiassa esteröintireaktiolla, kuten edellä on esitetty. Esteröinti voi tapahtua esimerkiksi siten, että toisen reaktioon osallistuvan yhdisteen karboksyyli ryhmän karbonyyli happi protonoituu. Tällöin karbonyyli ryhmä aktivoituu nukleofiilin hyökkäykselle. Nukleofiilinä toimii PEG:n hydroksyyli ryhmä. Katalyyttinä toimii DCC. Reaktiomekanismin mukaan muodostunut karbodi-imidi muuttuu aktiiviseen muotoon sykliseksi anhydridiksi, joka reagoi nukleofiilin kanssa pysyväksi tuotteeksi¹⁵³. Zalipsky *et. al.* ovat esittäneet, että DCC:n avulla aktivoituneen Boc-suojatun aminohapon liittäminen PEG:iin DMAP:n katalysoimana ei vaadi kovia olosuhteita¹⁶². Tästä johtuen Min *et. al.* käyttivät edellä

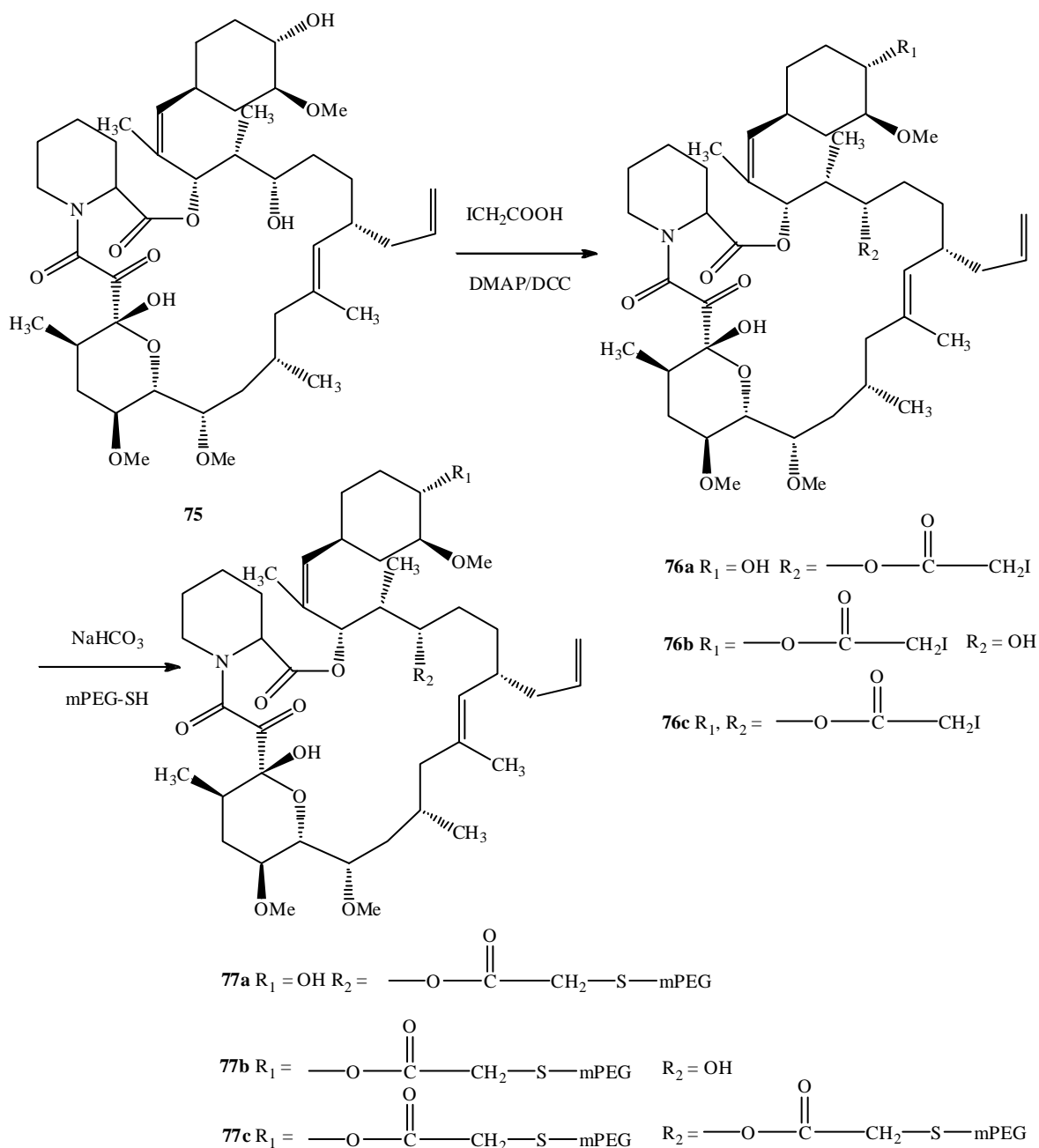
esitettyä DCC:n ja DMAP:n käyttöön perustuvaa synteesimenetelmää sekä PEG-aminohappojohdannaisia että pemetreksenin aihiolääkkeitä valmistaessaan.¹⁵⁴

4.1.2.10.3. Takrolimuusin PEG-aihiolääkkeet

Takrolimuusin (**75**) rakenteessa on 23-rengas, joka on makrolidirengasta muistuttava rakenne. Takrolimuusi on immunosuppressiivinen eli sillä on immuunivastetta vähentävä vaikutus. Se on neutraali yhdiste, joka liukenee hyvin useimpiin orgaanisiin liuottimiin. Takrolimuusin vesiliukoisuus on huono (4-12 µg/ml)^{163, 151, 164}.

Chung ja Cho syntetisoivat takrolimuusin metoksipolyetyleeniglykoliaasettiestereitä (**77a-c**) tarkoituksena valmistaa takrolimuusin vesiliukoinen aihiolääke (Kaavio 19)¹⁵¹. Synteesin ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan takrolimuusin jodiasetaattiestereitä (**76a-c**) asyloimalla takrolimuusin (**75**) tietyt hydroksyyliiryhmät. Synteesin lopputuotteena muodostuu takrolimuusin 24-jodiasetaattiesteriä (**76a**), takrolimuusin 32-jodiasetaattiesteriä (**76b**) ja takrolimuusin 24,32-dijodiasetaattiesteriä (**76c**). Ne erotetaan kromatografisesti.¹⁵¹

Takrolimuusin metoksipolyetyleeniglykoliaasettiesterit (**77a-c**) syntetisoidaan lähtöaineena käytettävistä takrolimuusin jodiasetaattiestereistä (**76a-c**) liuottamalla ne asetonitriiliin ja natriumvetykarbonaatin (NaHCO₃) seokseen, johon lisätään metoksipolyetyleeniglykolitioli (mPEG-SH) (Kaavio 19). Dietyylieetterin lisäyksen jälkeen lopputuotteet (**77a-c**) kiteytyvät. Ne ovat potentiaalisia takrolimuusin polyetyleeniglykoliaihiolääkkeitä, sillä ne ovat takrolimuusia vesiliukoisempia. Aihiolääkkeiden vesiliukoisuusarvoja ei ole esitetty kirjallisuudessa. Aihiolääkkeiden farmakologiset ominaisuudet ovat verrattavissa takrolimuusin vastaaviin, ja aihiolääkkeet muuttuvat elimistössä nopeasti aktiiviseksi lääkeaineeksi. Lisäksi ne ovat kemiallisesti pysyviä ja niitä voidaan annostella suun, nenän, keuhkojen ja ihon kautta sekä suonensisäisesti.¹⁵¹



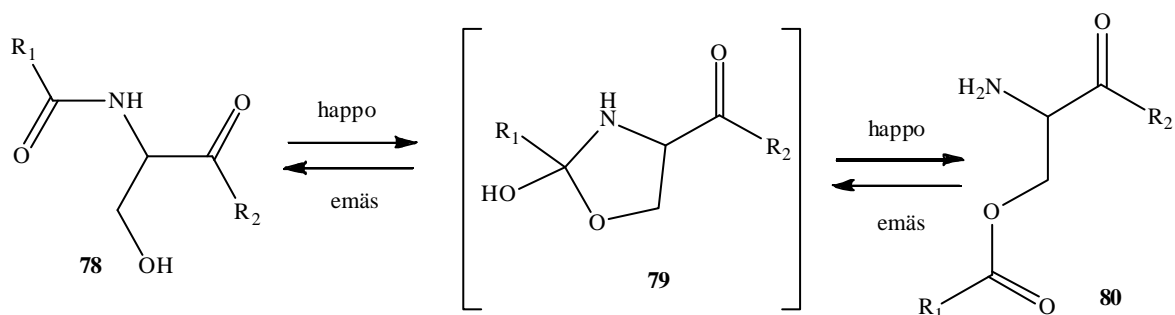
Kaavio 19. Takrolimuusin polyetyleeniglykoliaihiolääkkeiden (**77a-c**) synteisi.

4.1.2.11. Muita aihiolääke-esimerkkejä

4.1.2.11.1. N→O asyylitoisiintumisreaktio

Käsiteltäessä β -hydroksi- α -aminohapon (**78**) (esimerkiksi seriini tai treoniini) sisältäviä peptidejä vahvalla hapolla voi viereisten amino- ja hydroksyyliyhymien välillä tapahtua toisiintumisreaktio¹⁶⁵. Reaktio tapahtuu syklisen välivaiheen (**79**) kautta, ja β -hydroksyyliyhymä asyloituu (Kaavio 20). Muodostuu *O*-asyylipeptidi (**80**), jonka vesiliukoisuus on lisääntynyt rakenteeseen muodostuneen ionisoituvan aminoryhmän

vuoksi. *O*-asyylipeptidi voidaan nopeasti palauttaa takaisin alkuperäiseksi yhdisteeksi neutraaleissa tai heikosti emäksisissä olosuhteissa.^{11,166}



Kaavio 26. N→O asyylitoisiintumisreaktion mekanismi.¹⁵⁷

HI-virusta on kahta päätyyppiä. Näistä HIV-1 koodaa sille ominaista aspartaattiproteaasia eli proteiineja hajottavaa entsyymiä. Kyseinen entsyymi on vastuussa retrovirusten, joihin myös HIV kuuluu, lisääntymisestä. Tästä johtuen HIV-1 proteaasi on potentiaalinen kohde pyrittäessä kehittämään lääkkeitä, jotka estävät tehokkaasti HIV:n elinkiertoa.^{167,168}

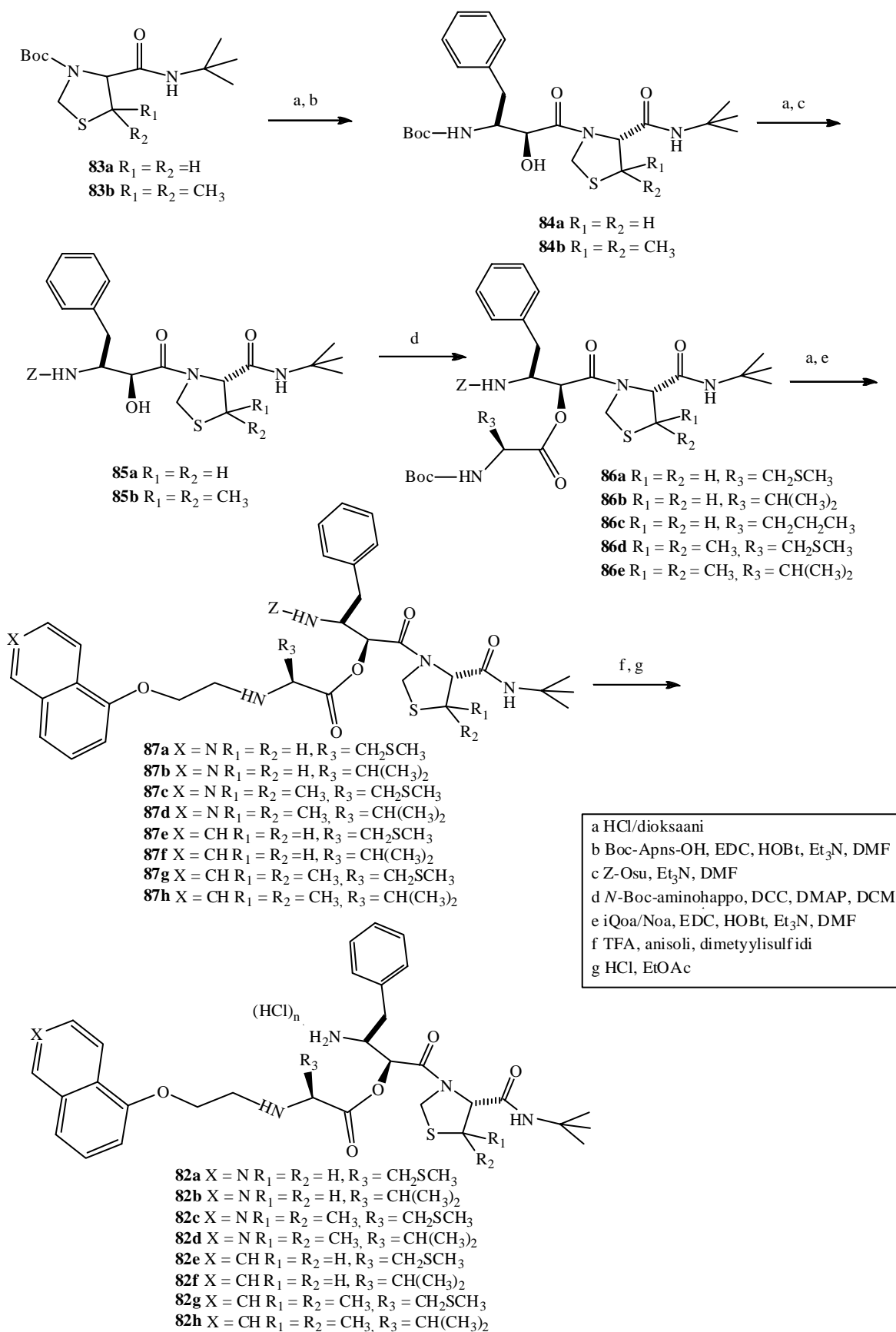
KNI-272 (**81a**) ja KNI-279 (**81b**) ovat HIV-1 proteaasin inhibiittoreita. Hamada *et. al.* syntetisoivat niiden vesiliukoisia aihiolääkkeitä (**82a-b**) sekä useita muita kemialliselta rakenteeltaan samankaltaisia aihiolääkkeitä (**82c-h**) (Kaavio 21, sivu 58)¹⁶⁸. Synteesin lähtöaineina käytettävistä suojatuista (*R*)-*N*-*tert*-butyyli-1,3-tiatsolidiini-4-karboksamidista¹⁶⁹ ja (*R*)-*N*-*tert*-butyyli-5,5-dimetyyli-1,3-tiatsolidiini-4-karboksamidista¹⁶⁹ (**83a-b**) poistetaan Boc-suojaryhmät. Tämän jälkeen liitetään uusi Boc-suojaryhmän sisältävä rakenne, jolloin muodostuu suojattuja dipeptidejä (**84a-b**). Boc-suojaryhmät korvataan *N*-(bentsyylioksikarbonyylioksi)sukkinimidi-suojaryhmillä (*Z*-OSu), minkä jälkeen muodostuneiden yhdisteiden (**85a-b**) vapaaseen hydroksyyliiryhmään liitetään erilaisia Boc-suojattuja aminohappoja. Tällöin muodostuu *O*-asyylidipeptidejä (**86a-e**). Boc-suojatun aminohapon α -hiilessä tapahtuu osittaista rasemoitumista, mutta tällaiset yhdisteet voidaan poistaa synteesin loppuvaiheessa. Boc-suojaryhmä poistetaan 5-isokinoyylioksietikkahapolla (iQoa) tai 1-naftoksietikkahapolla (Noa), ja tuotteena saadaan suojattuja aihiolääkkeitä (**87a-h**). Synteesin lopuksi poistetaan *Z*-suojaryhmä. Tämän jälkeen tehdään ioninvaihto käsittelemällä syntetisoituja aihiolääkkeitä HCl:lla ja etyyliasetaatilla, jolloin lopputuotteina saadaan syntetisoidut aihioläkkeet niiden suolamuodossa (**82a-h**).¹⁶⁸

Aihioläkkeet ovat yli 1000-kertaisesti vesiliukoisempia kuin varsinainen lääkeaine (Taulukko 9). Vesiliukoisuutta lisää aihioläkkeiden *O*-asyylirakenteessa oleva vapaa

hydrofiilinen aminoryhmä. Erityisesti aihiolääkkeet (**82a-d**) ovat erittäin vesiliukoisia (Taulukko 9). Lisäksi ne metaboloituvat fysiologisissa olosuhteissa nopeasti varsinaisiksi lääkeaineiksi. Aihiolääkkeiden (**82e-h**) vesiliukoisuus on edellä mainittuja selvästi heikompi (Taulukko 9). Tämän arvellaan johtuvan rakenteissa olevasta naftaleenirenkaasta. Aihiolääkkeissä (**82a-d**) naftaleenirenkaan tilalla oleva isokinoliinirengas kykenee protonoitumaan ja muodostamaan suolan käsiteltäessä sitä vahvalla hapolla.¹⁶⁸

Taulukko 9. Varsinaisten lääkeaineiden ja syntetisoitujen aihiolääkkeiden (**82a-h**) vesiliukoisuuksia.¹⁶⁸

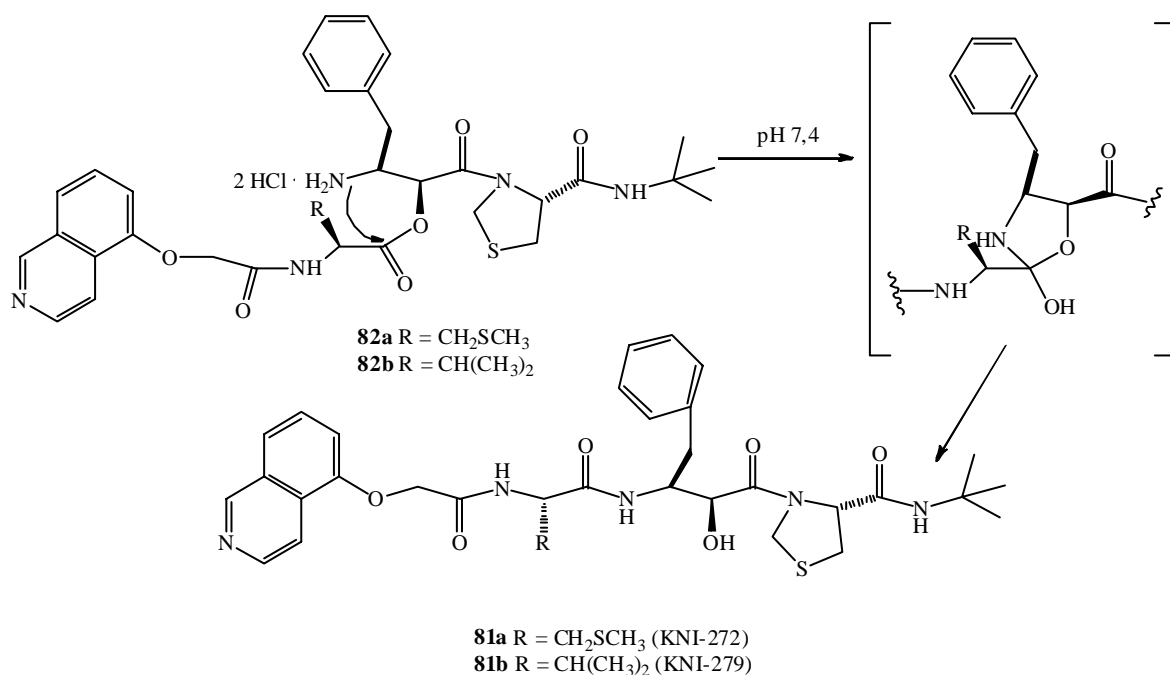
| Aihiolääke | Aihiolääkkeen vesiliukoisuus (mg/ml) | Lääkeaineen vesiliukoisuus (mg/ml) |
|-------------------|---|---|
| 82a | > 300 | 0,075 |
| 82b | > 300 | 0,079 |
| 82c | > 300 | 0,055 |
| 82d | > 300 | 0,041 |
| 82e | 3,7 | 0,0008 |
| 82f | 3 | 0,0025 |
| 82g | 4 | 0,0015 |
| 82h | 2,6 | 0,002 |



Kaavio 21. KNI-272:n ja KNI-279:n aihiolääkkeiden (**82a-b**) sekä kemialliselta rakenteeltaan samankaltaisten aihiolääkkeiden (**82c-h**) synteesi.

Syntetisoidut aihiolääkkeet (**82a-b**) muuttuvat N→O asylylitoisiintumisreaktion kautta varsinaisiksi lääkeaineiksi (**81a-b**) (Kaavio 22). Toisiintumisreaktion nopeuteen vaikuttavat sekä steeriset että elektrostaattiset tekijät. KNI-272:n (**81a**) toisiintumisreaktio tapahtuu huomattavasti nopeammin kuin KNI-279:n (**81b**). KNI-279:n rakenteessa on suurikokoinen isopropyyliryhmä, kun taas KNI-272:n rakenteessa on metyyliotiometriyliryhmä. Reaktion onnistumiseksi sen nopeuteen on pyrittävä vaikuttamaan esimerkiksi valitsemalla kemialliselta rakenteeltaan sopivia yhdisteitä tai muokkaamalla niiden rakenteita reaktion kannalta suotuisiksi.¹¹

Tyypillisesti aihiolääkkeet sisältävät spontaanisti tai entsyymaattisesti hajoavan aihio-osan ja lisäksi mahdollisesti myös linkkerin. N→O asylylitoisiintumisreaktion etuna on se, että syntetisoidut aihiolääkkeet muuttuvat varsinaisiksi lääkeaineiksi ilman ylimääräisten sivutuotteiden muodostumista. Toisiintumisreaktion hyödyntäminen on yksi mahdollinen vaihtoehto pyrittäessä ratkaisemaan HIV-1 proteaasin inhibiittoreiden huonoon vesiliukoisuuteen liittyviä ongelmia.^{11,168}



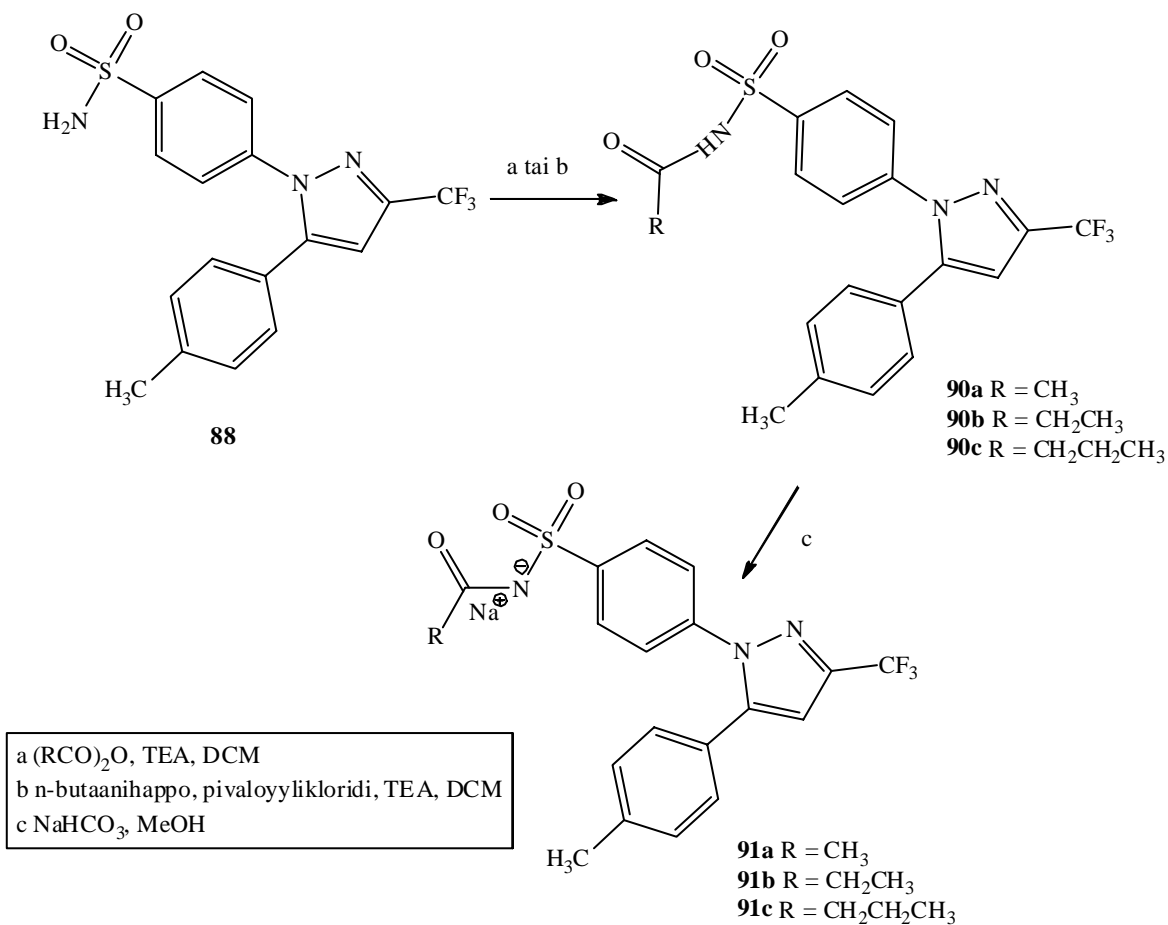
Kaavio 22. KNI-272:n ja KNI-279:n aihiolääkkeiden (**82a-b**) muuttuminen N→O asylylitoisiintumisreaktion avulla varsinaisiksi lääkeaineiksi (**81a-b**).

4.1.2.11.2. Selekoksibin ja sen johdannaisen aihiolääkkeet

Selekoksibi (4-[5-(4-metyylifenyyli)-3-(trifluorimetyyli)pyratsol-1-yyli]bentseenisulfonamidi) (**88**) (Kaavio 23) on COX-2-entsyymin estäjiin (COX-2-inhibiittori) kuuluva tulehduskipulääke, jota käytetään nivelrikon, nivelreuman ja kivun hoitoon¹⁷⁰. Mamidi *et. al.* sekä Singh *et. al.* syntetisoivat selekoksibin ja sen johdannaisen (**89**) aihiolääkkeitä tarkoituksena parantaa selekoksibin melko huonoa vesiliukoisuutta (< 50 µg/ml) ja farmakokineettisiä ominaisuuksia^{170,171}. Aihiolääkkeet valmistetaan modifioimalla selekoksibin johdannaisen sulfonamidi- ja hydroksimetyyliryhmiä tai selekoksibin sulfonamidiryhmää (Kaaviot 23-24).¹⁷¹

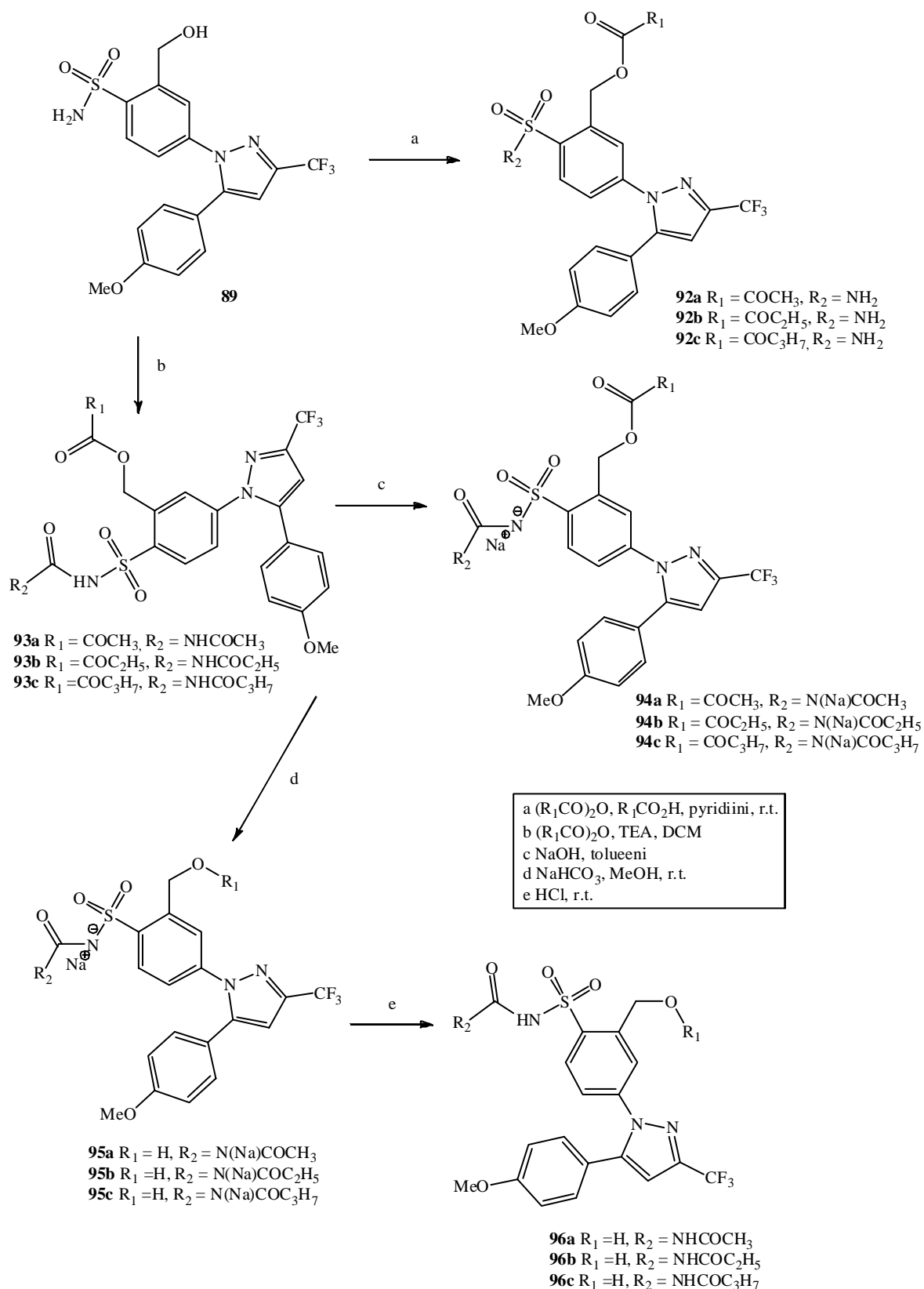
Selekoksibi (**88**) asyloidaan käyttämällä etikkahapon ja propionihapon anhydridejä TEA:n läsnä ollessa (Kaavio 23). Tällöin muodostuvat yhdisteet (**90a-b**). Yhdiste (**90c**) syntetisoidaan käsittelemällä selekoksibia butaanihaposta ja pivaloyylikloridista valmistetulla anhydridillä TEA:n läsnä ollessa. Nämä asyloidut tuotteet muutetaan vastaaviksi natriumsuoloikseen (**91a-c**) käsittelemällä niitä NaHCO₃:lla MeOH:ssa. Käyttämällä liuottimena MeOH:ia vältetään mahdollinen mono- ja diasyloituja suoloja sisältävän seoksen muodostuminen.^{170,171}

Selekoksibin johdannaisesta (**89**) syntetisoidaan sen aihiolääkkeitä, jotka ovat *O*-asyyli-, *N*-asyyli- ja *N,O*-diasyylijohdannaisia. *O*-asyylijohdannaiset (**92a-c**) syntetisoidaan pyridiinin katalysoimalla hydroksimetyyliryhmän kemoselektiivisellä asylaatiolla käyttämällä sopivaa anhydridiä vastaavan karboksyylihapon läsnä ollessa. *N,O*-diasyylijohdannaiset (**93a-c**) syntetisoidaan TEA:n katalysoimalla asylaatiolla käyttämällä sopivaa anhydridiä. *N,O*-diasyylijohdannaisten suolat (**94a-c**) valmistetaan vastaavista *N,O*-diasyylijohdannaisista (**93a-c**) käyttämällä NaOH:n vesiliuosta. Liuottimena käytetään toluenia, koska se ehkäisee NaOH:n ionisoitumista. Ionisoituminen voi aiheuttaa halutun esterin ei-toivotun hydrolyysin. *N*-asyloidut natriumsuolat (**95a-c**) syntetisoidaan *N,O*-diasyylijohdannaisten (**93a-c**) kemoselektiivisellä hydrolyysillä käyttämällä NaHCO₃:ia (1.9 ekv.) MeOH:ssa. *N*-asyloidut sulfonamidit (**96a-c**) valmistetaan vastaavista *N*-asyloiduista natriumsuoloista (**95a-c**) käsittelemällä niitä laimealla HCl:lla.¹⁷¹



Kaavio 23. Selekoksin aiholääkkeiden (**91a-c**) synteesi.

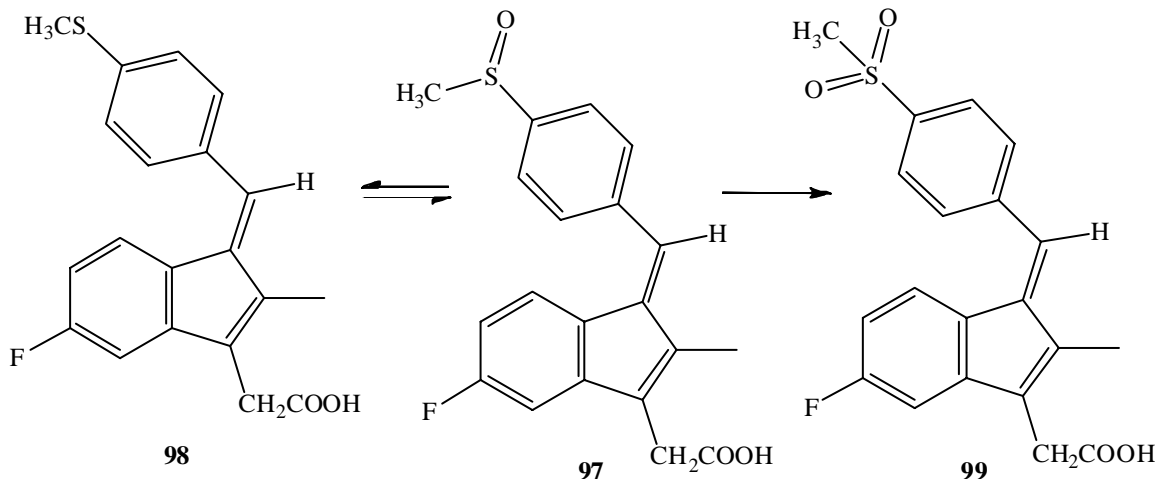
Valmistetut selekoksin *N*-asyylisulfonamidiainholääkkeet (**91a-c**) ovat huomattavasti vesiliukoisempia kuin selekoksi. Niiden vesiliukoisuus on noin 15 mg/ml. Niiden metaboloitumisessa aktiiviseksi lääkeaineeksi on eroja. Myös suurin osa selekoksin johdannaisen (**89**) aiholääkkeistä on erittäin vesiliukoisia. Esimerkiksi aiholääkkeen (**95b**) vesiliukoisuus on 230 mg/ml (lämpötilassa 25 °C). Lisäksi se on potentiaalinen COX-2-inhibiittori, joka voidaan annostella sekä suun kautta että suonensisäisesti.^{170,171}



Kaavio 24. Selekoksin johdannaisesta (**89**) valmistettujen aiholiäkkeiden (**92a-c**, **94a-c**, **96a-c**) synteesi.

4.1.2.11.3. Sulindaakki

Sulindaakki (sulindaakkisulfoksidi) (**97**) (Kaavio 25) on tulehduskipulääkkeenä käytettävä indeenijohdannainen, joka imeytyy nopeasti suun kautta otettaessa. Sulindaakki on sulindaakkisulfidin (**98**) vesiliukoinen prekursori. Imeytymisen jälkeen sulindaakki metaboloituu elimistössä reversiibelisti pelkistymällä aktiiviseksi metaboliitiksi eli sulindaakkisulfidiksi. Tällä metaboliatuotteella on tulehdusta ja kipua lievittäviä ominaisuuksia. Sulindaakki metaboloituu myös irreversiibelisti hapettumalla sulindaakkisulfoniksi (**99**), jolla on syöpäsolujen jakautumista estävä vaikutus. Sulindaakki ja sen metaboliitit sitoutuvat plasman albumiiniin. Fysiologisessa pH:ssa sulindaakin vesiliukoisuus on noin 3,3 mg/ml. Se on noin 100 kertaa vesiliukoisempi kuin sulfidimetaboliittinsa, jonka vesiliukoisuus on 0,03 mg/ml.^{11,172}



Kaavio 25. Sulindaakki (**97**) ja sen metaboliatuotteet (**98**, **99**).

4.2. FYSIKAALISIA JA MUITA MENETELMIÄ

4.2.1. Kiinteät dispersiot

Dispersio tarkoittaa nestemäisessä tai kiinteässä faasissa olevien hienojakoisten partikkeleiden tasaisesti jakautunutta, pysyvää systeemiä. Kiinteässä dispersiossa (engl. solid dispersion) yksi tai useampi aktiivinen, olomuodoltaan kiinteä, komponentti muodostaa systeemin. Kun tarkoituksena on lisätä lääkeaineiden vesiliukoisuutta, nämä komponentit ovat hydrofiilinen, kiteinen tai amorfinen kantaja ja hydrofobinen lääkeaine. Amorfinen aine tarkoittaa kiinteää ainetta, jossa rakenneyksiköillä ei ole tarkkaa järjestystä. Yleisesti käytettyjä kantajia ovat esimerkiksi polyvinyylipyrrolidoni (PVP), Plasdone-S630 ja surfaktantit, kuten Tween 80, natriumlauryylisulfaatti ja

natriumdioktyylisulfosukkinaatti eli natriumdokusaatti. Kun kiinteä dispersio joutuu vuorovaikutukseen veden kanssa, kantaja liukenee ja lääkeaine vapautuu erittäin hienoina kolloidipartikkeleina. Tällä tavalla saadaan lisättyä tehokasta pinta-alaa, minkä seurauksena lääkeaineen vesiliukoisuus lisääntyy ja liukeneminen nopeutuu. Lisäksi lääkeaineen imeytyminen ja biologinen hyötyosuus kasvavat. Lisääntynyt liukoisuus perustuu dispergoituneen lääkeaineen muodostamiin hienorakenteisiin kiteisiin, jotka sulautuvat vesiliukoisen kantajan rakenteeseen. Tämä tehostaa liukenemiseen tarvittavaa kontaktia olomuodoltaan kiinteän lääkeaineen ja nestefaasin välillä.^{6,7,8,173-175}

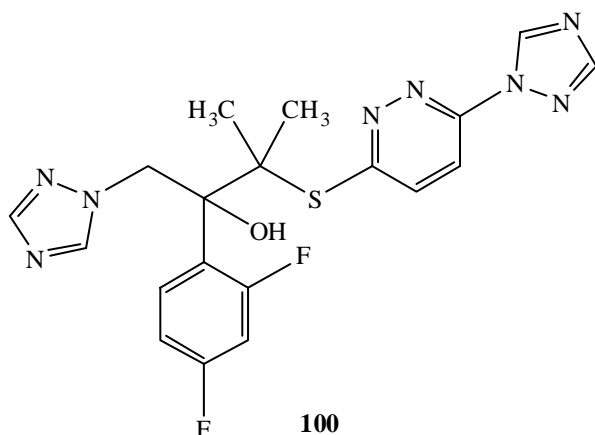
Kiinteitä dispersioita voidaan valmistaa eri tavoilla. Sulatusmenetelmässä (engl. hot-melt method, fusion method) lääkeaineen ja vesiliukoisen kantajan seosta lämmitetään, kunnes molemmat sulavat. Sulanut seos jäädytetään, jonka jälkeen sen annetaan kiinteytyä nopeasti jäähauteessa voimakkaasti sekoittaen. Muodostunut kiinteä massa voidaan murskata, jauhaa ja siivilöidä sekä puristaa tablettimuotoon apuaineiden avulla. Menetelmän etuja ovat sen yksinkertaisuus ja edullisuus. Sulatusmenetelmän onnistumiseksi lääkeaineen ja kantajan on sekoitettava sulamisen jälkeen. Sulatusmenetelmässä lämpötilan on oltava yli 100 °C, mikä saattaa johtaa lämmön aiheuttamaan lääkeaineen hajoamiseen⁹. Sekä lääkeaineen että kantajan onkin kestävä korkeita lämpötiloja.^{6,7,173}

Liuotinmenetelmässä (engl. solvent evaporation method) lääkeaine ja kantaja liuotetaan johonkin sopivaan orgaaniseen liuottimeen. Tämän jälkeen liuotin haihdutetaan alipaineessa ja saadaan kiinteä dispersio. Liuotin voidaan poistaa myös esimerkiksi sumukuivauksella (engl. spray-drying) tai kylmäkuivauksella (engl. freeze-drying)⁸. Lääkeaine voidaan myös liuottaa esimerkiksi propyleeniglykoliin, ja lisätä näin saatu liuos kantajan joukkoon. Tässä menetelmässä lämpötilan aikaansaama lääkeaineen tai kantajan mahdollinen hajoaminen voidaan estää, sillä orgaanisen liuottimen haihdutukseen riittää matalahko lämpötila. Liuotinmenetelmän ongelmia ovat sen pitkäkestoisuus ja korkeat kustannukset. Lisäksi lopputuotteeseen saattaa jäädä mahdollisesti toksisia liuotinjämiä käytetyistä orgaanisista liuottimista. Liuotinmenetelmä edellyttää sekä lääkeaineen että kantajan liukenemistä orgaaniseen liuottimeen.^{6,7,173}

4.2.1.1. MFB-1041:n vesiliukoisuuden parantaminen valmistamalla kiinteä dispersio

MFB-1041:llä ((+)-2-(2,4-difluorifenyyli)-3-metyyli-1-(1*H*-1,2,4-triaatsol-1-yyli)-3-[6-(1*H*-1,2,4-triaatsol-1-yyli)-pyridatsin-3-yyli]butan-2-oli)¹⁷⁶ **(100)** (Kuva 7) on

antifungaalista eli sienten kasvua ehkäisevää vaikutusta, ja sitä voitaisiinkin mahdollisesti käyttää lääkkeenä aspergillus-sukuun kuuluvien sienten aiheuttamien sairauksien hoidossa. MFB-1041:n vesiliukoisuus on huono (1,2 µg/ml pH:ssa 6,8 ja 3,6 µg/ml pH:ssa 1,2) ja se imeytyy huonosti suun kautta otettuna. Kai *et. al.* valmistivat lääkeaineesta ja polymeeristä kiinteän dispersion parantaakseen MFB-1041:n vesiliukoisuutta ja imeytymistä¹⁷⁷. Kiinteän dispersion valmistamiseen he käyttivät sumukuivausmenetelmää.¹⁷⁷



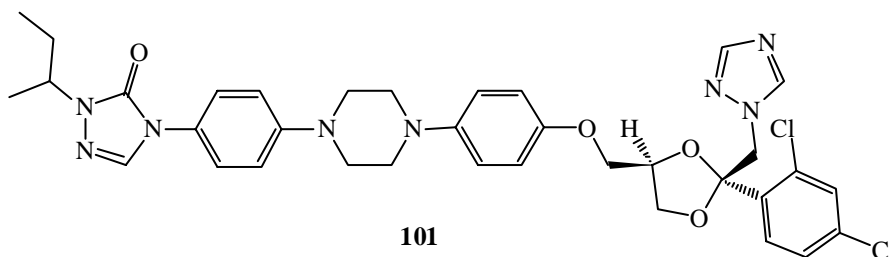
Kuva 7. MFB-1041:n (**100**) rakenne.

MFB-1041 liuotetaan dikloorimetaania (DCM) ja EtOH:ia sisältävään seokseen ja joukkoon liuotetaan polymeeri (MFB-1041:n ja polymeerin suhde 1:1-1:5). Polymeereinä käytetään hydroksipropyyliselluloosaa (HPC-L®), hydroksipropyylimetyyliselluloosa 2910:tä (HPMC, Metolose® 60SH-50), hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaattia (HP-55®) tai karboksिमetyylietyyliselluloosaa (CMEC®). Kiinteät dispersiot valmistetaan käyttämällä menetelmään sopivaa laitetta. Lääkeainetta sisältävä liuos sumutetaan pisaroina kuumaan (90 °C) kaasuvirtaan. Liuottimien haihtumisen jälkeen kuivuneet partikkelit erotetaan kaasuvirrasta.¹⁷⁷

Kun polymeerinä on hydroksipropyyliselluloosa, sumukuivauksen jälkeen muodostuu kova ja tahmea massa. Muita edellä mainittuja polymeerejä käytettäessä saadaan pehmeää, ilmavaa jauhetta (partikkelikoko 500-850 µm). MFB-1041:stä ja hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaatista sekä karboksिमetyylietyyliselluloosasta muodostettu kiinteä dispersio parantaa lääkeaineen liukenemistä ja edesauttaa sen imeytymistä suun kautta otettaessa.¹⁷⁷

4.2.1.2. Itrakonatsolin vesiliukoisuuden parantaminen valmistamalla kiinteä dispersio

Itrakonatsoli (2-butan-2-yyli-4-[4-[4-[4-[(2*R*,4*S*)-2-(2,4-dikloorifenylyli)-2-(1,2,4-triatsol-1-yyli]metoksi]fenyyli]piperatsin-1-yyli]fenyyli]-1,2,4-triatsoli-3-oni)¹⁷⁸ (**101**) (Kuva 8) on suun kautta otettava antifungaalinen lääkeaine sieni-infektioiden hoitoon. Se on heikosti emäksinen (p*K*_a-arvo noin 3,7) ja sen vesiliukoisuus on noin 30 µg/ml¹⁷⁸. Itrakonatsolin vesiliukoisuutta on pyritty parantamaan eri menetelmillä, mutta ne vaativat erityistä tekniikkaa sekä välineitä ja sisältävät vaativia työvaiheita.¹⁷⁹



Kuva 8. Itrakonatsolin (**101**) rakenne.

Jungin *et. al.* tarkoituksena oli parantaa itrakonatsolin vesiliukoisuutta ja imeytymistä käyttämällä yksinkertaista kiinteän dispersion menetelmää¹⁷⁹. Käytetyt hydrofiiliset polymeerit olivat joko pH:sta riippuvaisia tai siitä riippumattomia. Itrakonatsolia sisältävät kiinteän dispersion partikkelit valmistettiin käyttämällä liuotinmenetelmää, jonka jälkeen valmistettuja partikkeleita tutkittiin eri menetelmillä.¹⁷⁹

Itrakonatsoli ja sopiva hydrofiilinen polymeeri liuotetaan DCM:iin (itrakonatsolin ja polymeerin suhde 1:1,5). Käytetyistä polymeereistä muun muassa Poloxamer® 188, PVP ja HPMC ovat pH:sta riippumattomia. AEA® ja Eudragit® E 100 ovat pH:sta riippuvaisia. Partikkelit valmistetaan sumukuivausmenetelmällä lämpötilassa 45 °C käyttämällä tarkoitukseen sopivaa laitetta.¹⁷⁹

Hydrofiilisistä polymeereistä ja itrakonatsolista muodostetut kiinteät dispersiot lisäävät itrakonatsolin vesiliukoisuutta (Taulukko 10). Vesiliukoisuus kasvaa enemmän, mikäli käytetään pH:sta riippuvaisia polymeerejä verrattuna pH:sta riippumattomiin polymeereihin. Lisäksi itrakonatsoli liukenee paremmin tableteista, jotka sisältävät sumukuivausmenetelmällä valmistettuja kiinteän dispersion partikkeleita, kuin markkinoilla olevista valmisteista. Käytetty menetelmä on yksinkertainen, ja sen avulla on mahdollista valmistaa tablettien lisäksi esimerkiksi kapseleita ja rakeita sekä muita suun kautta otettavia valmistemuotoja.¹⁷⁹

Taulukko 10. Itrakonatsolin vesiliukoisuus sen ja hydrofiilisen polymeerin muodostamassa kiinteässä dispersiossa (pH 1,2).¹⁷⁹

| Polymeeri | Itrakonatsolin vesiliukoisuus (µg/ml)^a |
|------------------|--|
| Ei polymeeriä | 30 |
| Poloxamer® 188 | 13,7 ± 0,9 |
| PVP | 75,2 ± 4,8 |
| HPMC | 162,8 ± 4,7 |
| AEA® | 264,5 ± 0,8 |
| Eudragit® E 100 | 254,5 ± 2,1 |

^aKeskiarvo ± keskihajonta

4.2.2. Nanosuspensiot

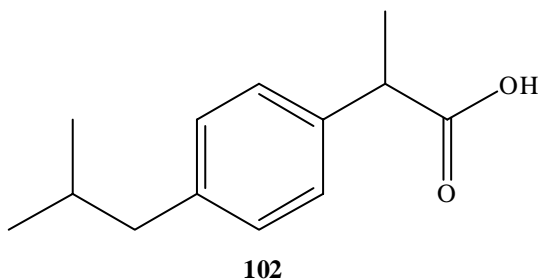
Farmaseuttiset nanosuspensiot voidaan määritellä nanokokoisten lääkeainepartikkeleiden kolloidisiksi dispersioiksi. Nanosuspensiot ovat kaksifaasisysteemejä ja sisältävät lääkeainepartikkeleiden lisäksi stabiloijina käytettäviä surfaktantteja. Nanosuspensioita voidaan valmistaa lääkeaineista, jotka liukenevat huonosti sekä veteen että öljyihin. Nanosuspensioiden avulla voidaan myös vähentää lääkeaineiden toksisuutta.^{5,6,9,180}

Nanosuspensioita voidaan valmistaa esimerkiksi saostamalla tai homogenisoimalla korkeassa paineessa. Saostusmenetelmässä lääkeaine liuotetaan ensin sopivaan liuottimeen, ja saatu seos lisätään sellaisen liuottimen joukkoon, johon se ei liukene. Saostusmenetelmän etuja ovat sen yksinkertaisuus ja edullisuus, mutta haasteena on välttää kokoaan kasvattavien lääkeainekiteiden muuttuminen mikropartikkeleiksi. Lisäksi lääkeaineen on oltava liukoinen ainakin yhteen käytettävään liuottimeen, mutta tämä ei saa liueta toiseen käytettävään liuottimeen.^{5,6,9}

Homogenisoinnissa lääkeaine liuotetaan surfaktanttia sisältävään vesiliuokseen voimakkaasti sekoittaen. Seosta käsitellään homogenisaattorissa korkeassa paineessa. Tällöin vesi kiehuu paineolosuhteista johtuen huoneenlämpötilassa, ja muodostuu kaasukuplia, jotka räjähtävät nesteen poistuessa laitteen aukosta. Lääkeaineen mikropartikkelit muuttuvat näin nanopartikkeleiksi. Homogenisointia käytetään erityisesti valmistettaessa nanosuspensioita huonosti vesiliukoisista lääkeaineista.^{5,6,9}

4.2.2.1. Ibuprofeenin nanosuspensio

Ibuprofeeni ((*RS*)-2-[4-(2-metyylipropyli)fenyyli]propanihappo)¹⁸² (**102**) (Kuva 9) on laajasti käytetty tulehduskipulääke. Sen vesiliukoisuus on noin 56 µg/ml. Kocbek *et. al.* valmistivat nanosuspensioita, joissa he käyttivät lääkeaineena ibuprofeenia¹⁸². Tarkoituksena oli parantaa ibuprofeenin liukenemistä ja biologista hyötyosuutta.¹⁸²



Kuva 9. Ibuprofeenin (**102**) rakenne.

Nanosuspensiot valmistettiin eri menetelmillä. Liuottimen diffuusiomenetelmässä (engl. solvent diffusion method) kokeiltiin useita orgaanisia liuottimia, joista etyyliasetaatti osoittautui parhaimmaksi. Ibuprofeeni liuotetaan etyyliasetaattiin, kaadetaan stabiloijia sisältävään veteen ja sekoitetaan. Saatu emulsio homogenisoidaan korkeassa paineessa, liuotetaan veteen, homogenisoidaan uudelleen orgaanisen liuottimen erottamiseksi ja pisarat muutetaan kiinteiksi partikkeleiksi.¹⁸²

Emulsifikaation sulatusmenetelmässä (engl. melt emulsification method) ibuprofeeni lisätään stabiloijia sisältävän vesiliuoksen joukkoon ja suspensio lämmitetään ibuprofeenin sulamispisteeseen (lämpötilaan 75 °C) sekä homogenisoidaan. Muodostunut emulsio homogenisoidaan uudelleen, ja lämpötila pidetään ibuprofeenin sulamispisteen alapuolella. Muodostunut emulsio jäähdytetään joko hitaasti huoneenlämpötilassa tai jäähauteessa. Menetelmä on käyttökelpoinen vaihtoehto valmistettaessa ibuprofeenin nanosuspensioita. Prosessin aikana voidaan vaikuttaa partikkelikokoon muuttamalla prosessin kulkua ja siihen vaikuttavia tekijöitä, kuten lääkeaineen konsentraatiota, jäähdytysolosuhteita ja homogenisoinnin kulkua. Menetelmässä ei tarvitse käyttää orgaanisia liuottimia.¹⁸²

Kocbekin *et. al.* tulosten perusteella ibuprofeenin vesiliukoisuus paranee valmistamalla siitä nanosuspensio. Ibuprofeenin liukenemisnopeus on huono, sillä vain 6 % lääkeaineesta liukenee ensimmäisen 10 minuutin aikana. Valmistetusta ibuprofeenin nanosuspensiosta lääkeaineesta liukenee 79 % ensimmäisen 10 minuutin aikana. Tällä

tavalla on mahdollista lisätä ibuprofeenin biologista hyötyosuutta ja parantaa sen turvallisuutta vähentämällä sen aiheuttamaa ärsytystä ruoansulatuskanavassa. Pienimpien lääkeainepartikkeleiden liukenemisen todettiin olevan nopeinta.¹⁸²

4.2.3. Partikkelikoko ja nanopartikkelit

Lääkeaineen liukoisuus on yleensä riippuvainen partikkelikoosta. Partikkelikoon pienentämisen seurauksena kasvava pinta-ala parantaa lääkeaineen liukenemismahdollisuuksia. Partikkelikoko pienennetään yksinkertaisin menetelmin, kuten jauhamalla ja sumukuivaamalla.⁷

Kiinteät lipidinanopartikkelit ovat pieniä hiukkasia, halkaisijaltaan noin 50-1000 nm. Ne ovat peräisin öljy-vesi-emulsioista, joissa nestemäinen rasva tai öljy korvataan kiinteällä rasvalla. Kiinteät lipidinanopartikkelit koostuvat kiinteistä rasvoista, emulgointiaineista ja vedestä. Rasvat ovat yleensä triglyseridejä, rasvahappoja, steroideja tai vahoja. Kiinteät lipidinanopartikkelit ovat vaihtoehto emulsioille ja liposomeille pyrittäessä lisäämään suun kautta annosteltavien huonosti vesiliukoisten lääkeaineiden biologista hyötyosuutta.^{9,173}

4.2.4. Polymorfiset muodot

Lääkeaineiden polymorfinen muuttaminen mahdollistaa vesiliukoisuuden parantamisen. Polymorfismi on yhdisteen kyky esiintyä erilaisissa kemiallisissa muodoissa. Lääkeaineen eri polymorfiset muodot ovat kemiallisesti samanlaisia, mutta niillä on erilaiset fysikokemialliset ominaisuudet kuten liukoisuus, sulamispiste, tiheys, rakenne ja pysyvyys. Eräät lääkeaineet voivat esiintyä amorfisessa muodossa. Niiden ajatellaan olevan korkeimmalla energiatasolla ja niitä voidaan pitää alijäähtyneinä nesteinä. Niiden vesiliukoisuus on suurempi kuin kidemuodossa, koska ne vaativat vähemmän energiaa siirtääkseen molekyylin liuottimeen.⁸

4.2.5. Itse-emulgoituvat systeemit

Emulsiot, mikroemulsiot ja itse-emulgoituvat systeemit (engl. self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS) kuuluvat emulsifioituihin systeemeihin. Emulsiot ovat kahden toisiinsa sekoittumattoman nesteen seoksia. Toinen nesteistä (sisäfaasi) on asettunut toisen nesteen (ulkofaasi) sisään pieniksi pisaroiksi. Emulsiot koostuvat näiden lisäksi surfaktanteista ja kosurfaktanteista eli pintajännitystä alentavista aineista. Emulsiot ovat sameita, mikroemulsiot kirkkaita ja läpikuultavia. Emulsio saattaa olla termodynaamisesti

pysymätön. Tähän voidaan vaikuttaa muuttamalla nestemäinen emulsio kiinteään muotoon esimerkiksi sumukuivauksen avulla poistamalla nestefaasi. Mikroemulsiot sen sijaan ovat termodynaamisesti pysyviä ja niiden viskositeetti on huono.^{7,9,173}

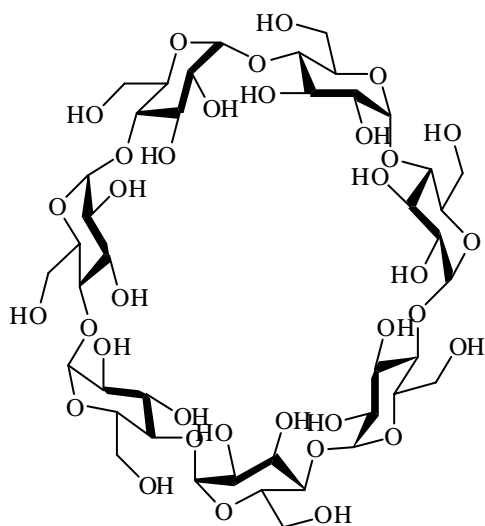
Itse-emulgoituvat systeemit koostuvat luonnollisesta tai synteettisestä öljystä, kiinteästä tai nestemäisestä surfaktantista, apuliuottimista ja lääkeaineesta. Ne muodostavat öljy-vesi-emulsion päästyään kosketuksiin vesifaasin kanssa. Tässä lääkeaine on pieninä pisaroina (1-100 nm) emulsiossa, mikä parantaa huonosti vesiliukoisen lääkeaineen liukenemistä, imeytymistä ja biologista hyötyosuutta sekä mahdollistaa annostelun suun kautta. Lääkeaine saadaan vapautumaan ruoansulatuskanavassa emulsiosta kontrolloidusti, ja lisäksi lääkeaineen aiheuttamaa ärsytystä on mahdollista vähentää. Öljypisaroiden koko ja varaus vaikuttavat imeytymisen tehokkuuteen ruoansulatuskanavasta. Itse-emulgoituvissa systeemeissä surfaktanttien osuus on suhteellisen suuri, joten niiden aiheuttama ruoansulatuskanavan ärsytys ja toksisuus on otettava huomioon. Ionisoitumattomien surfaktanttien on todettu olevan vähemmän toksisia verrattuna ionisoituviin surfaktantteihin. Näiden lisäksi lääkeaineen liukoisuudella eri öljyihin, kosolventteihin ja surfaktantteihin on merkitystä.^{9,33,74,173,183}

Itse-emulgoituvia systeemejä voidaan valmistaa esimerkiksi sumujäähdytyksellä, sumukuivauksella tai ylikriittisiin nesteisiin perustuvilla menetelmillä käyttämällä tarkoitukseen sopivia laitteita. Karakterisointi tapahtuu esimerkiksi tekemällä termodynaamisia pysyvyystutkimuksia, määrittämällä viskositeetti, partikkelikoko ja konduktiivisuus tai visuaalisella arvioinnilla. Käytettävien surfaktanttien valintaan on kiinnitettävä huomiota, sillä vain tietyt surfaktantit soveltuvat otettaviksi suun kautta. Esimerkkejä käytetyistä surfaktanteista ovat polysorbaatti 20 (Tween 20), polysorbaatti 80 (Tween 80), sorbitanmono-oleaatti (Span 80) ja Labrasol. Käytettäviä apuliuottimia ovat esimerkiksi EtOH, glyseriini ja propyleeniglykoli. Farmaseuttisissa emulsioissa käytetään triglyserideihin kuuluvia öljyjä, kuten soijaöljy, seesaminsiemenoiljy, puuvillansiemenöljy ja safloriöljy.^{9,75,173,183,184}

4.2.6. Syklodekstriinit

Muodostamalla inkluusiokompleksi (engl. inclusion complex) on mahdollista parantaa huonosti vesiliukoisten lääkeaineiden vesiliukoisuutta, liukenemisnopeutta ja biologista hyötyosuutta. Inkluusiokompleksi muodostuu poolittoman molekyylin tai molekyylin poolittoman osan liittyessä toisen molekyylin tai molekyylyiryhmän (ns. isäntä) onkaloon.

Yleisimmin käytetyt isäntämolekyylit ovat syklodekstriinejä. Syklodekstriinit ovat α -*D*-glukopyranoosiyksiköistä koostuvia sykliisiä oligosakkaridimolekyylejä, joissa glukopyranoosiyksiköt ovat liittyneet toisiinsa α -(1,4)-glykosidisillä sidoksilla^{7,8,68,174,185}. Yleisimpiä, ja farmaseuttisesti mielenkiintoisia, ovat luonnolliset syklodekstriinit eli α -, β - ja γ -syklodekstriinit, jotka sisältävät kuudesta kahdeksaan glukoosiyksikköä. Kuvassa 10 on esitetty β -syklodekstriinin (**103**) rakenne. Syklodekstriinit ovat kartionmuotoisia, molemmista päistään avoimia molekyylejä. Molekyylin sisäpuoli on hydrofobinen johtuen poolittomasta hiilirungosta ja glukoosiyksiköiden eetterisidoksista. Ulkopuolella olevat primaariset ja sekundaariset hydroksyyliiryhmät tekevät siitä hydrofiilisen. Primaariset hydroksyyliiryhmät voivat pyöriä vapaasti, mutta sekundaariset hydroksyyliiryhmät ovat jäykkiä^{68, 6-9,68,173,174,185,186}.



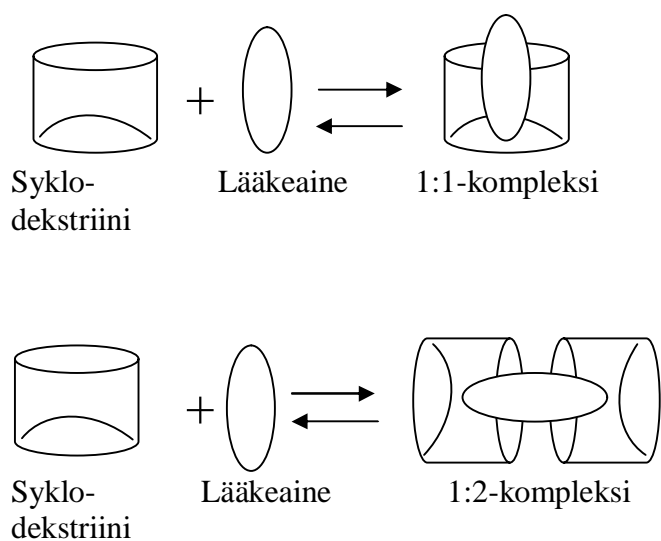
103

Kuva 10. β -syklodekstriinin (**103**) rakenne.

Syklodekstriinin rakenteesta johtuen heikosti vesiliukoinen lääkeaine voi tunkeutua sen onkaloon, jolloin muodostuu edellä mainittu inkluusiokompleksi^{68,174,185}. Inkluusiokompleksissa lääkeaineen ja syklodekstriinin välillä vallitsee ei-kovalenttinen vuorovaikutus¹⁷¹. Lääkeaineen jääminen kompleksin sisään vaikuttaa sen fysikokemiallisiin ominaisuuksiin kuten vesiliukoisuuteen ja liukenemisnopeuteen^{7,8,68}.

Syklodekstriinien avulla voidaankin lisätä lääkeaineen vesiliukoisuutta ja nopeuttaa liukenemistä sekä parantaa biologista hyötyosuutta^{173,186}. Lääkeaineen rakenteesta ja ominaisuuksista riippuen sen ja syklodekstriinin välille voi muodostua 1:1- tai 1:2-

kompleksi (Kaavio 26). Kompleksinmuodostus riippuu myös esimerkiksi pH:sta, lämpötilasta ja käytetystä liuottimesta⁶⁸. Tärkeä merkitys on lisäksi syklodekstriinin rakenteessa olevan onkalo-koolla. Esimerkiksi α -syklodekstriinin onkalo on kooltaan pienin, joten kovin moni lääkeaine ei kykene kompleksoitumaan siihen. Kyseinen syklodekstriini pystyy kompleksoimaan pienen molekyyli- tai alifaattisen sivuketjun sisältäviä lääkeaineita. Muista luonnollisista syklodekstriineistä β -syklodekstriinit kompleksoivat heterosyklisiä yhdisteitä ja aromaattisen renkaan sisältäviä rakenteita ja γ -syklodekstriinit esimerkiksi makrosyklejä ja steroideja.^{186,187}



Kaavio 26. Syklodekstriinin ja lääkeaineen muodostamat 1:1- ja 1:2-kompleksit.⁶

Syklodekstriinejä on käytetty onnistuneesti useissa kymmenissä markkinoilla olevissa lääkevalmisteissa niiden liukenemisnopeuden parantamiseksi¹⁷³. Ensin käytettiin β -syklodekstriiniä, koska se on helposti saatavilla ja sen ominaisuudet mahdollistavat käytön useiden eri lääkeaineiden kanssa. Sen vesiliukoisuus (18,5 mg/ml) ei kuitenkaan ole optimaalinen johtuen molekyyllinsisäisestä vetysidosten muodostumisesta¹⁸⁸. Tämän vuoksi sen tilalle on pyritty kehittämään muita vaihtoehtoja¹⁸⁶. Esimerkiksi 2-hydroksipropyli- β -syklodekstriini (HPBCD)¹⁸⁹, metyyli- β -syklodekstriini (RAMEB)¹⁸⁹ ja sulfobutyylietteri- β -syklodekstriini ovat vesiliukoisempia ja vähemmän toksisia^{190,191}. Muiden luonnollisten syklodekstriinien vesiliukoisuudet ovat huomattavasti parempia kuin β -syklodekstriinin, sillä α -syklodekstriinin vesiliukoisuus on 145 mg/ml ja γ -syklodekstriinin 232 mg/ml¹⁸⁸. Syklodekstriinit ja niiden johdannaiset ovat käyttökelpoisia apuaineita, mutta niiden turvallisuudesta ei ole tutkimuksissa saatu täyttä varmuutta.

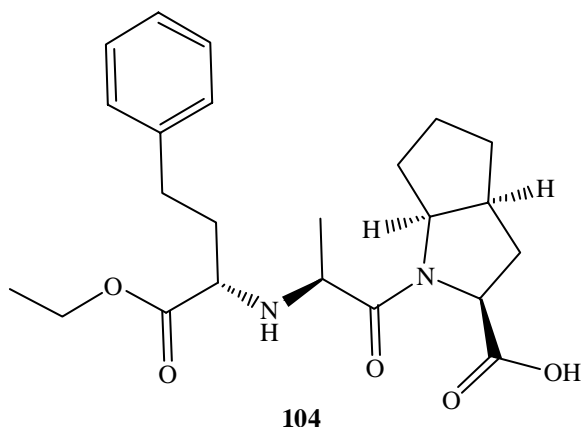
Luonnolliset syklodekstriinit ovat turvallisia annosteltaessa suun kautta tai suonensisäisesti paitsi β -syklodekstriini, jota ei annostella suonensisäisesti johtuen sen munuaistoksisuudesta.^{9,174}

Syklodekstriinien inkluusiokomplekseja voidaan valmistaa eri menetelmillä¹⁷⁴. Vaivausmenetelmässä (engl. kneading method) syklodekstriiniä käsitellään pienellä määrällä vettä tai alkoholin vesiliuosta, jolloin syklodekstriini muuttuu taikinamaiseksi. Lääkeaine lisätään joukkoon, ja seoksen annetaan vaivautua, jonka jälkeen se kuivataan ja siivilöidään. Pienillä määrillä voidaan käyttää huumarettia ja survinta ja suuremmassa mittakaavassa työskenneltäessä tarkoitukseen sopivaa laitetta.⁶

Kylmäkuivausmenetelmän avulla saadaan huokoista, amorfista jauhetta, jossa vuorovaikutus syklodekstriinin ja lääkeaineen välillä on tehokasta. Liuotin poistetaan syklodekstriiniä ja lääkeainetta sisältävästä seoksesta kylmäkuivaamalla alipaineessa. Menetelmä on haasteellinen, sillä siinä tarvitaan erityisiä välineitä, prosessi on pitkäkestoinen ja saanto saattaa jäädä huonoksi. Inkluusiokompleksi voidaan valmistaa myös mikroaaltoreaktorissa. Lääkeaine ja syklodekstriini liuotetaan veden ja sopivan orgaanisen liuottimen seokseen, ja reaktion annetaan tapahtua mikroaaltoreaktorissa (60 °C, 1-2 min). Tämän jälkeen seokseen lisätään edellä käytettyjä sopivia liuottimia, jolloin vapaaksi jäänyt lääkeaine ja syklodekstriini saadaan poistettua seoksesta. Muodostunut sakka suodatetaan ja kuivataan alipaineessa. Lopputuotteeseen voi jäädä pieniä määriä orgaanisia liuottimia¹⁷⁴. Muita valmistusmenetelmiä ovat sumukuivaus ja saostus^{192,6}.

4.2.6.1. Inkluusiokompleksin valmistaminen ramipriilista ja β -syklodekstriinistä

Ramipriili (1-[2-(1-etoksikarbonyyli-3-fenyylipropyyliamino)propionyyl]oktahydro-syklopenta[b]-pyrroli-2-karboksyylihappo)¹⁹³ **(104)** (Kuva 11) kuuluu angiotensiinikonvertaasientsyymien estäjiin (ACE-estäjä) ja sitä käytetään verenpainelääkkeenä. Sen biologinen hyötyosuus on huono ja vesiliukoisuus on noin 0,1 mg/ml¹⁹⁴. Jagdalen *et. al.* tarkoituksena oli parantaa ramipriilin vesiliukoisuutta ja nopeuttaa sen liukenemistä valmistamalla siitä ja β -syklodekstriinistä tai HPBCD:stä inkluusiokomplekseja¹⁹⁵. HPBCD-johdannainen osoittautui β -syklodekstriiniä vesiliukoisemmaksi.¹⁹⁵



Kuva 11. Ramipriilin (**104**) rakenne.

Ramipriilin ja syklodekstriinien muodostamat seokset (1:1) valmistetaan sekoittamalla huhmaressa. Inklusiokompleksien valmistuksessa voidaan käyttää eri menetelmiä. Vaivausmenetelmässä lääkeaine ja syklodekstriini jauhetaan huhmaressa liuotettuna pieneen määrään veden ja MeOH:n seosta. Saatua massaa vaivataan ja kuivataan korkeassa lämpötilassa (400 °C). Lopuksi kuivattu massa jauhetaan ja suodatetaan. Haihdutusmenetelmässä (engl. coevaporation method) lääkeaine liuotetaan alkoholiin ja joukkoon lisätään syklodekstriinin vesiliuos. Seosta sekoitetaan ja se haihdutetaan kuiviin. Kuiva massa jauhetaan ja suodatetaan. Jauhamisenmenetelmässä (engl. cogrinding method) lääkeaine sekoitetaan pieneen määrään MeOH:ia huhmaressa niin, että se liukenee. Tämän jälkeen lisätään syklodekstriini ja sekoitetaan voimakkaasti huoneenlämpötilassa kunnes liuotin haihtuu.¹⁹⁴

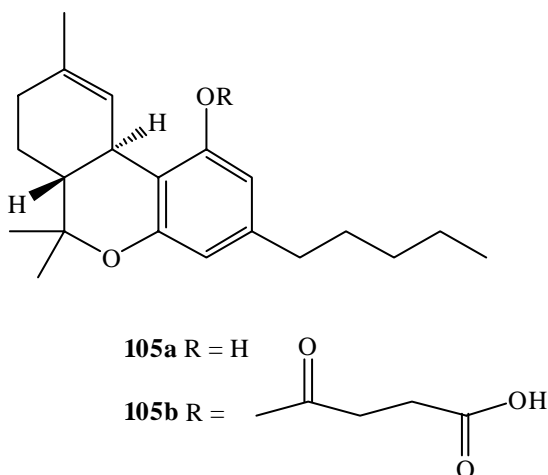
Kylmäkuivausmenetelmässä yhtä suuret määrät lääkeainetta ja syklodekstriiniä lisätään tislattun veden joukkoon ja sekoitetaan useita vuorokausia. Seos kylmäkuivataan ja saatu jäännös jauhetaan ja suodatetaan. Sulatusmenetelmässä (engl. melting method) yhtä suuret määrät lääkeainetta ja syklodekstriiniä sekoitetaan upokkaassa, ja seoksen annetaan sulaa pitämällä upokasta vesihauteessa jatkuvasti sekoittaen. Sulanut seos jäähdetään hitaasti huoneenlämpötilassa. Kiinteää tuotetta kuivataan, se jauhetaan ja suodatetaan. Sumukuivausmenetelmässä lääkeaineen ja syklodekstriinin seos liuotetaan veteen ja sumukuivataan lämpötilassa 120 °C käyttämällä tarkoitukseen sopivaa laitetta.¹⁹⁴

Valmistetut seokset ja inklusiokompleksit karakterisoidaan käyttämällä esimerkiksi UV-spektroskopiaa tai Fourier muunnos infrapunaspektrometrialla (FTIR). Ramipriilin sekä siitä muodostetun kompleksin liukenemisprofiileiden perusteella ramipriilin liukenemisnopeus kasvaa merkittävästi inklusiokompleksin muodostamisen seurauksena.

Ramipriilin vapautuminen sen ja β -syklodekstriinin muodostamasta kompleksista on lähes 80 % vesiliuoksessa ja yli 80 % fosfaattipuskurissa (pH 6,8), kun kompleksi on muodostettu käyttämällä vaivausmenetelmää. Samoin ramipriilin vapautuminen sen ja HPBCD:n muodostamasta kompleksista on yli 80 % vesiliuoksessa ja yli 85 % fosfaattipuskurissa, kun kompleksi on muodostettu käyttämällä vaivausmenetelmää. Pelkän lääkeaineen vapautuminen vesiliuoksessa on noin 50 % ja fosfaattipuskurissa noin 60 %.¹⁹⁴

4.2.6.2. Tetrahydrokannabinolin aihiolääkkeen ja β -syklodekstriinin inkluusiokompleksi

Tetrahydrokannabinoli (Δ^9 -THC tai THC) (**105a**) on kannabinoideihin kuuluva kannabiskasvin pääasiallinen yhdiste¹⁹⁶. Sitä käytetään huumaavana aineena, mutta tämän lisäksi esimerkiksi pahoinvointilääkkeenä kemoterapiahoitojen yhteydessä sekä ruokahalun herättämiseen anoreksiaa sairastavilla AIDS-potilailla. THC:sta on syntetisoitu sen hemisukkinaattiesteriaihiolääke (THC-HS) (**105b**) (Kuva 12). Upadhye *et. al.* ovat tutkineet mahdollisuutta muodostaa inkluusiokompleksi siitä ja β -syklodekstriinistä¹⁸⁹. He käyttivät RAMEB:iä ja HPBCD:iä. Inkluusiokompleksit valmistettiin kylmäkuivaamalla ja ne karakterisoitiin FTIR:n ja ydinmagneettisen resonanssispektroskopian (NMR) avulla. THC-HS:n vesiliukoisuus on parempi käytettäessä RAMEB:iä kuin HPBCD:iä (Taulukko 11). Lisäksi THC-HS:n ja RAMEB:n muodostaman inkluusiokompleksin vesiliukoisuus on suurempi verrattuna THC:n ja RAMEB:n muodostamaan kompleksiin.¹⁸⁹



Kuva 12. Tetrahydrokannabinolin (**105a**) ja sen hemisukkinaattiesterin (**105b**) rakenteet.

Taulukko 11. THC:n (**105a**) ja THC-HS:n (**105b**) vesiliukoisuudet (mM) niiden ja RAMEB:n sekä HPBCD:n muodostamissa inkluusiokomplekseissa.¹⁸⁹

| Yhdiste | RAMEB (150 mM) ^a | HPBCD (150 mM) ^a |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 105a | 5,63 ± 0,9 | 4,49 ± 1,2 |
| 105b | 8,088 ± 0,65 | 3,24 ± 0,89 |

^aKeskiarvo ± keskihajonta

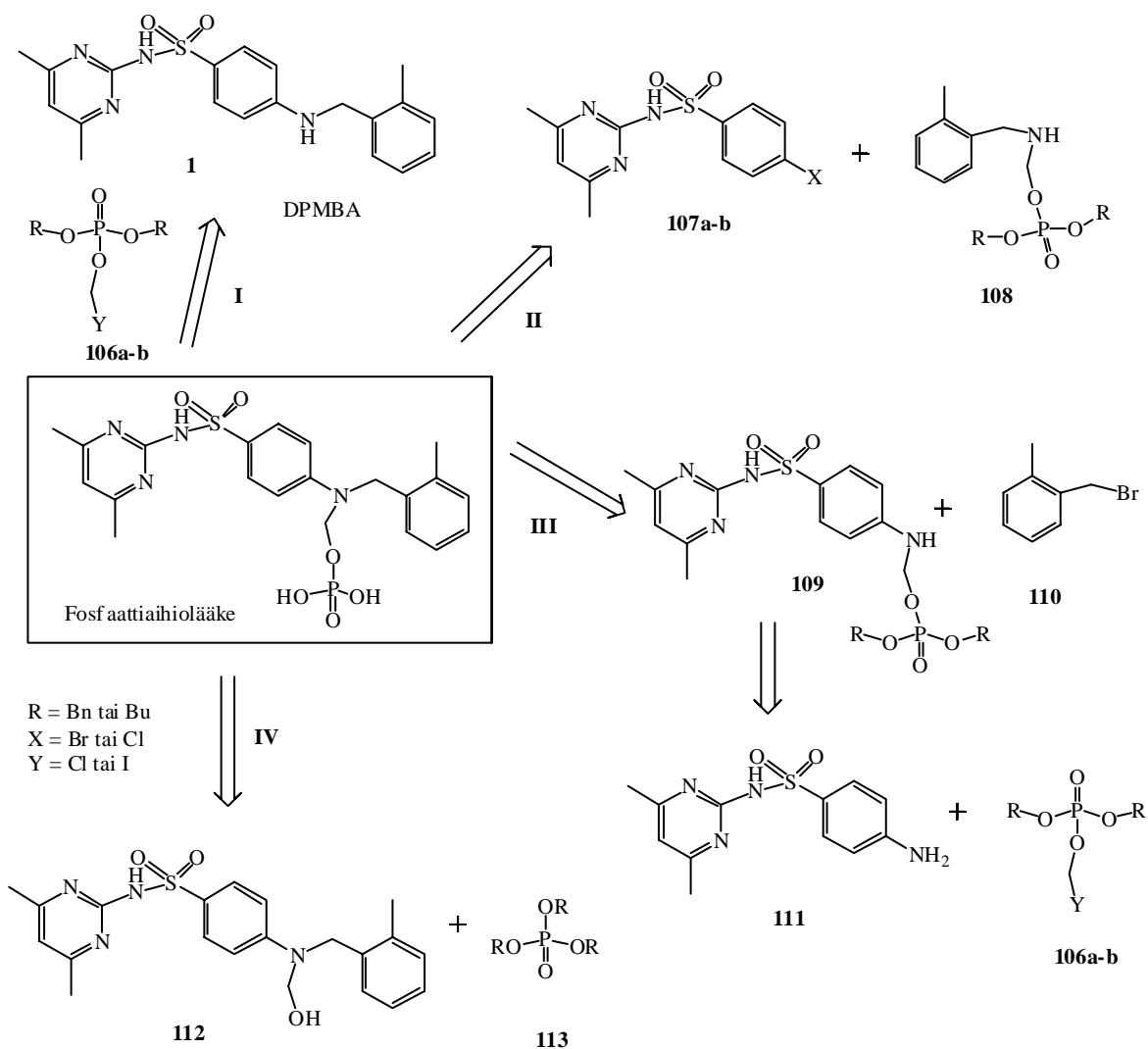
KOKEELLINEN OSA

5. TYÖN TARKOITUS

Tutkielman kokeellisen osan tarkoituksena oli lääkeainekandidaatti DPMBAn vesiliukoisuuden parantaminen liittämällä siihen fosfaattiesterirakenne. DPMBAn synteesi on esitetty kirjallisuudessa¹². Fosfaattien käytöstä aihio-osana on olemassa useita esimerkkejä^{62,111,112,197,198}. Näissä tapauksissa varsinaisen lääkeaineen vesiliukoisuutta on pystytty parantamaan merkittävästi liittämällä molekyyliin fosfaattirakenne. Kirjallisuudessa on kuvattu dialkyyli- ja dibentsyylikloorimetyylifosfaattien synteesit, joiden avulla fosfaattiaihio-osa voidaan liittää lääkeaineeseen S_N2-reaktiolla.¹⁹⁹

Työ sisälsi neljä eri synteesistrategiaa (I-IV, Kaavio 27). Strategiassa I syntetisoitiin DPMBAn (**1**) ja aihio-osina käytettävät dibentsyyli- ja dibutyylidikloorimetyylifosfaatit (**106a-b**), ja niiden liittämistä toisiinsa tutkittiin eri menetelmillä. Strategioissa II ja III tutkittiin fosfaattiaihiolääkkeen kokoamista kahdesta molekyylistä, joista toiseen fosfaattiosa oli liitetty valmiiksi. Strategiassa IV tarkasteltiin hydroksimetyyliryhmän liittämistä DPMBAn:han. Fosfaattiesteri voitaisiin mahdollisesti liittää DPMBAn:han sen avulla.

Työn alussa DPMBAn liukoisuutta testattiin lisäämällä DPMBAn ja veden seokseen eri happoja (fosforihappo, etikkahappo, rikkihappo, sitruunahappo ja suolahappo), mutta liukenemista ei tapahtunut (ks. Kappale 7.2.). Toisessa kokeessa DPMBAn liuotettiin DMSO:iin ja joukkoon lisättiin vesiliukoisuutta lisäävä polysorbaatti 80 (Tween 80) sekä lopuksi fysiologinen suolaliuos (0,9 % NaCl-liuos). DPMBAn ei kuitenkaan liuennut.



Kaavio 27. Vaihtoehtoiset strategiat fosfaattiaihioläkkeen valmistamiseksi.

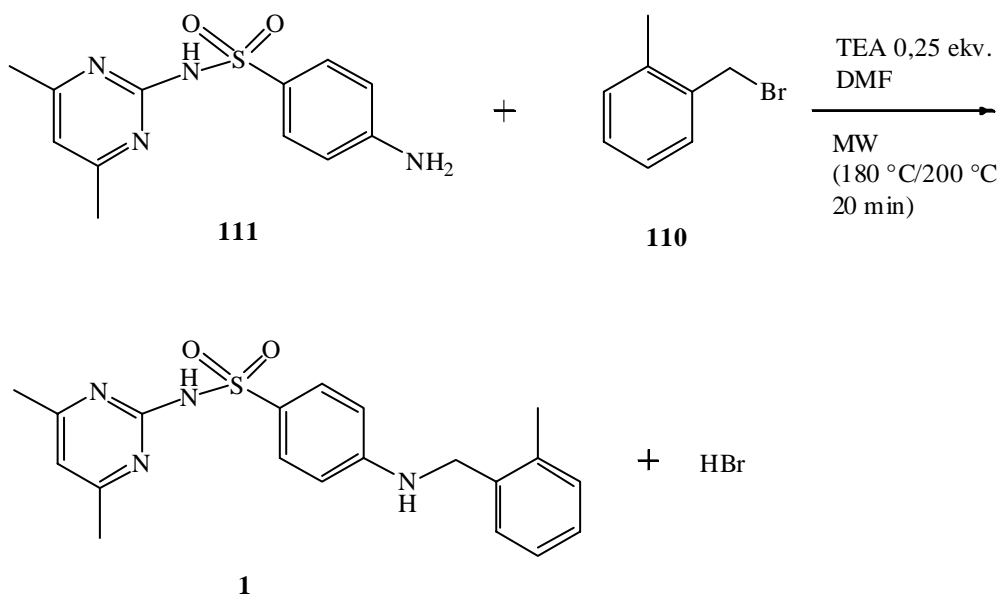
6. SYNTEESIT JA NIIDEN TULOKSET

Tässä kappaleessa kuvataan lyhyesti tutkielman kokeellisessa osassa tehdyt synteesit ja saadut tulokset. Selvyyden vuoksi synteesistrategioiden yksityiskohtainen kuvaus on esitetty kappaleessa 7.

6.1. SYNTEESISTRATEGIA I

6.1.1. DPMBA:n synteesi

Kirjallisuudessa on kuvattu DPMBA:n synteesi, jossa lähtöaineita refluksoidaan MeOH:ssa yön yli cesiumkarbonaatin (Cs_2CO_3) toimiessa emäksenä¹². Kokeellisessa osassa DPMBA:n synteisiä kokeiltiin mikroaaltoreaktorissa reaktioajan lyhentämiseksi (Kaavio 28).



Kaavio 28. DPMBA:n (1) synteesi.

Reaktion lähtöaineet sulfametatsiini (111) (1 ekv.) ja 2-metyyllibentsylibromidi (110) (1 ekv.) sekä emäksenä toiminut TEA (0,25 ekv.) liuotettiin *N,N*-dimetyyliformamidiin (DMF). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa, ja raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. DPMBA:n (1) saanto vaihteli reaktiosta riippuen kohtalaisesta hyvään (39-75 %).

DPMBA:n synteesi tehtiin onnistuneesti mikroaaltoreaktorissa useaan kertaan. Reaktioaika pidettiin koko ajan samana (20 minuuttia). Reaktiolämpötilana kokeiltiin ensin lämpötilaa 200 °C ja myöhemmin lämpötilaa 180 °C. Maksimipaine reaktioiden aikana vaihteli lämpötilasta riippuen välillä 2,0-4,8 baaria. Lämpötilaa laskettiin, koska reaktion saanto oli parempi lämpötilassa 180 °C.

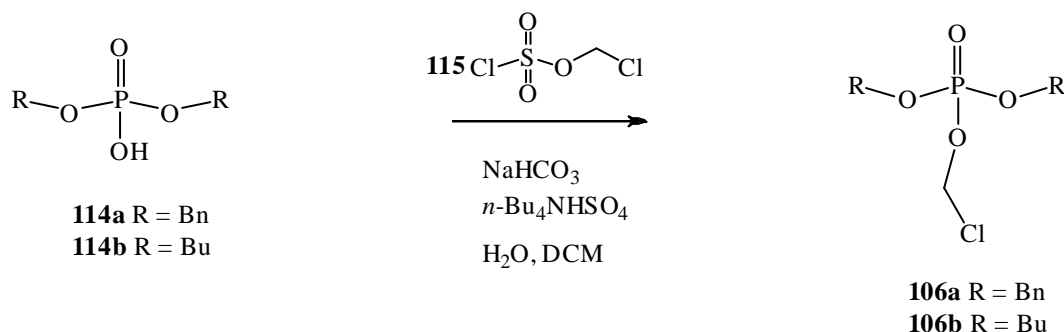
Synteisiä kokeiltiin myös vaihtoehtoisilla tavoilla siten, että emäksenä TEA:n tilalla oli Cs_2CO_3 ja liuottimena joko DMF tai 2-metyylitetrahydrofuraani (2-MeTHF). Koska 2-

MeTHF:n kiehumispiste (66 °C) on alempi kuin DMF:n (153 °C), sen poistaminen haihuttamalla alipaineessa olisi nopeampaa DMF:iin verrattuna. 2-MeTHF ei muodosta peroksiedeja kuten THF tai dietyylieetteri. Lisäksi sulfametatsiini (**111**) liukenee hyvin 2-MeTHF:iin. Sulfametatsiinin liukoisuutta kokeiltiin useisiin liuottimiin ja todettiin, ettei se liukene asetoniin, asetonitriiliin, DCM:iin tai etyyliasetaattiin. 2-MeTHF:n toimiessa liuottimena korkeaa lämpötilaa ei kuitenkaan voitu käyttää, joten DMF valittiin mikroaaltoreaktorissa tehtävän reaktion liuottimeksi.

DPMBA:n synteesi on kuvattu aiemmin kirjallisuudessa siten, että lähtöaineita on refluksoitu MeOH:ssa yön yli ja tällöin saanto on ollut 20 %¹². Käyttämällä mikroaaltoreaktoria reaktioaika voitiin lyhentää 20 minuuttiin ja parantaa saantoa.

6.1.2. Kloorimetyylifosfaattien synteesi

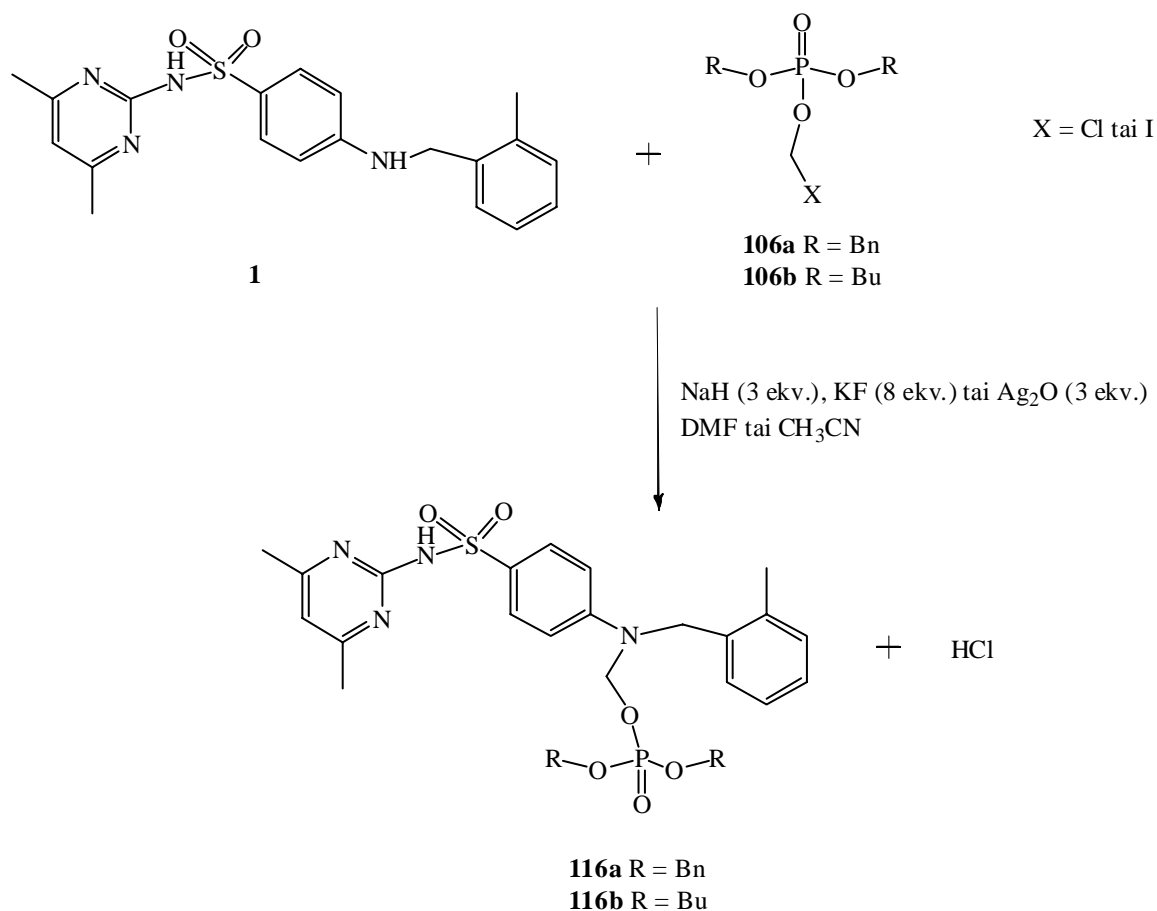
Kirjallisuudessa on kuvattu neljän kloorimetyylifosfaatin synteesi¹⁹⁹. Niitä on mahdollista käyttää aihio-osana pyrittäessä valmistamaan alkuperäisestä lääkeaineesta vesiliukoisempi fosfaattiainiolääke. Tutkielman kokeellisessa osassa valmistettiin kahta erilaista kloorimetyylifosfaattia, dibentsyylikloorimetyylifosfaattia (**106a**) ja dibutyylidikloorimetyylifosfaattia (**106b**) (Kaavio 29).



Kaavio 29. Dibentsyyli- ja dibutyylidikloorimetyylifosfaattien (**106a-b**) synteesi.

Dibentsyyli- tai dibutyylifosfaatti (**114a-b**) (1 ekv.), NaHCO₃ (4 ekv.) ja tetrabutyyliammoniumvetysulfaatti (*n*-Bu₄NHSO₄) (0,1 ekv.) liuotettiin veteen, lisättiin DCM sekä kloorimetyylidikloorisulfaatti (**115**) (1,2 ekv.) ja sekoitettiin yön yli. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Dibentsyylikloorimetyylifosfaattia (**106a**) saatiin synteestistä riippuen kohtalaisella tai hyvällä saannolla (23-82 %) ja dibutyylidikloorimetyylifosfaatin (**106b**) saanto vaihteli myös kohtalaisesta hyvään (29-74 %).

6.1.3. Kloorimetyylifosfaattien liittäminen DPMBa:han



Kaavio 30. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen (**116a-b**) synteesi (Kaavio 27, I).

Dibentsyyli- ja dibutyylidikloorimetyylifosfaattien (**106a-b**) liittämistä DPMBa:han (**1**) kokeiltiin eri tavoin (Kaavio 30). Kirjallisuudessa on kuvattu bentsimidatsolikarbamaatin vesiliukoisen fosfaattiaihiolääkkeen synteesi liittämällä lääkeaineeseen vesiliukoisuutta lisäävänä rakenteena metyleeni-di-*tert*-butyylifosfaatti²⁰⁰. Kyseinen fosfaattiaihiio-osa on liitetty bentsimidatsolikarbamaatin imidatsolirenkaan tyypeen (N1), ja emäksenä on toiminut natriumhydridi (NaH) (3 ekv.). Kyseisissä reaktioissa vähäisempi määrä emästä huononsi saantoa ja suurempi määrä lisäsi sivutuotteena muodostuvan dimeerin eli metyleeni-bis-bentsimidatsolin määrää. Kirjallisuuteen pohjautuen NaH:iä käytettiin siten 3 ekvivalenttia.

DPMBa (**1**) (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin, johon lisättiin NaH (3 ekv.) sekä **106a** (R=Bn, X=Cl) (1,4 ekv.). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa, ja raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Synteesin lopputuotteena ei muodostunut suojattua DPMBa:n fosfaattiaihiolääkettä (**116a**).

Di-*tert*-butyylijodimetyylifosfaattia on syntetisoitu di-*tert*-butyylikloorimetyylifosfaatin ja natriumjodidin (NaI) reaktiolla sopivassa liuottimessa²⁰¹. Kemiällisen reaktion nopeus riippuu muun muassa lähtevän ryhmän ominaisuuksista, ja jodi on lähtevänä ryhmänä klooria parempi. Jodiatomi on kooltaan klooriatomia suurempi, ja sen hiilen kanssa muodostama sidos on heikompi kuin kloorin hiilen kanssa muodostama sidos. Reaktioita DPMBAn (1) ja dibentsyyli- tai dibutyylijodimetyylifosfaatin (106a-b) välillä kokeiltiin, mutta ne eivät myöskään tapahtuneet.

Koska reaktio ei tapahtunut NaH:n avulla, NaH korvattiin kaliumfluoridilla (KF). DPMBAn (1) (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin, johon lisättiin KF (8 ekv.) koko ajan sekoittaen. Fosfaattiaihiio-osa (106a) (R=Bn, X=Cl) (1,3 ekv.) tai (106b) (R=Bu, X=Cl) (1,3 ekv.) ja NaI (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin, jolloin kloori korvautui jodilla ja dibentsyyli- tai dibutyylijodimetyylifosfaatti muodostui. Tämä lisättiin DPMBAn ja KF:a sisältävän seoksen joukkoon. Reaktiot eivät edistyneet 24 tunnin kuluessa. Seosta, johon oli lisätty dibutyylijodimetyylifosfaatti, refluksoitettiin yön yli. Tämän jälkeen reaktioita kokeiltiin vielä mikroaaltoreaktorissa, mutta suojattua DPMBAn fosfaattiaihiolääkettä (116a-b) ei muodostunut.

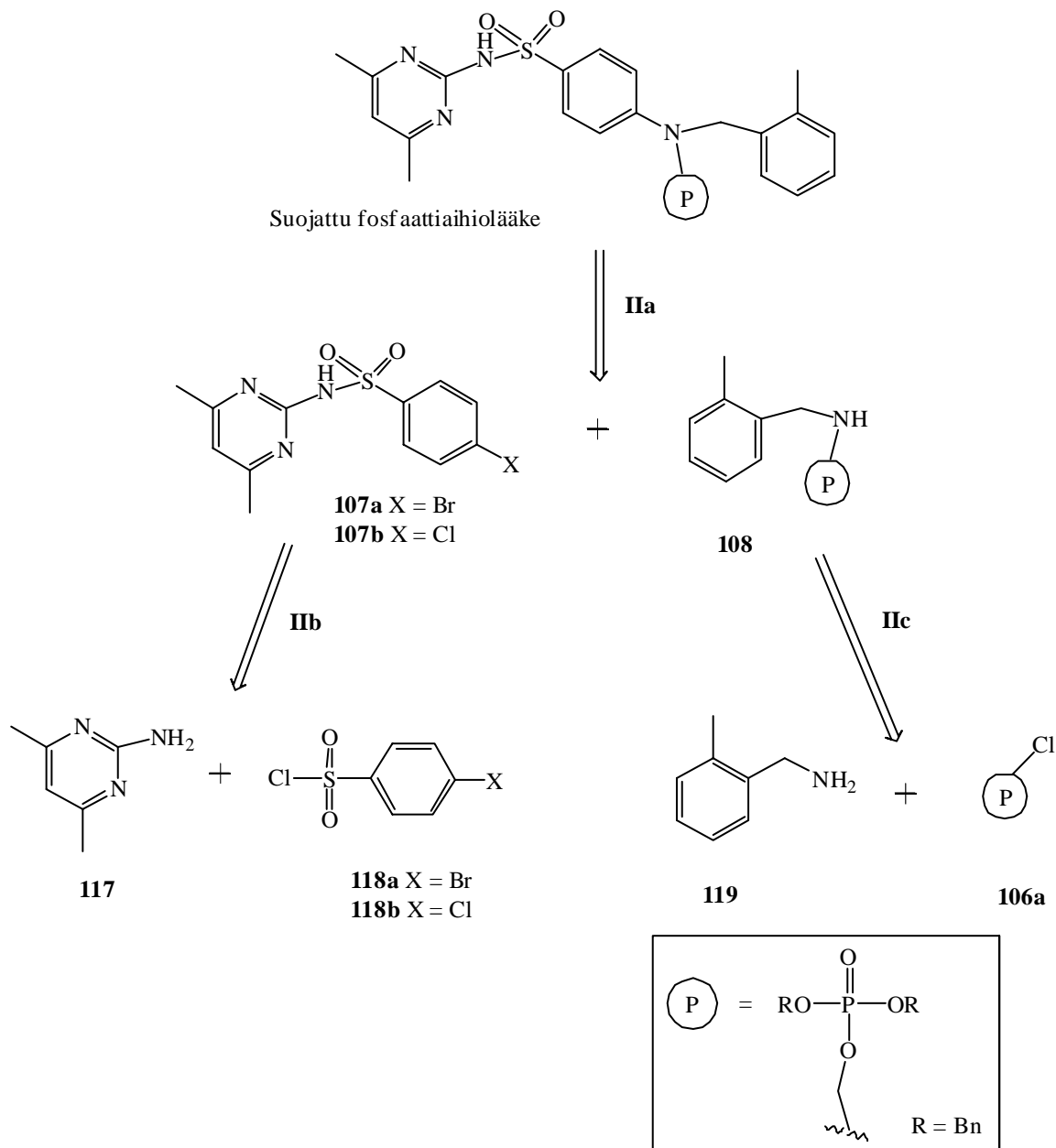
Kirjallisuudessa mainitaan butyyli-2-jodiasetaatin ja metyyli-2-jodiasetaatin liittäminen erilaisiin omenahapon estereihin Ag₂O:n avulla käyttämällä sitä 3 ekvivalenttia asetonitriilissä.²⁰² Ohjetta soveltaen DPMBAn (1) (1 ekv.) liuotettiin asetonitriiliin ja joukkoon lisättiin Ag₂O (3 ekv.) koko ajan sekoittaen. Fosfaattiaihiio-osa (106a) (R=Bn, X=Cl) (1,3 ekv.) ja NaI (1 ekv.) liuotettiin asetonitriiliin, ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa. Tämä lisättiin DPMBAn ja Ag₂O:ia sisältävän seoksen joukkoon. Reaktiota sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli sekä lämmitettiin ja refluksoitettiin. Lisäksi sitä kokeiltiin mikroaaltoreaktorissa. Suojattu DPMBAn fosfaattiaihiolääke (116a) ei muodostunut.

6.2. SYNTEESISTRATEGIA II

6.2.1. Johdanto

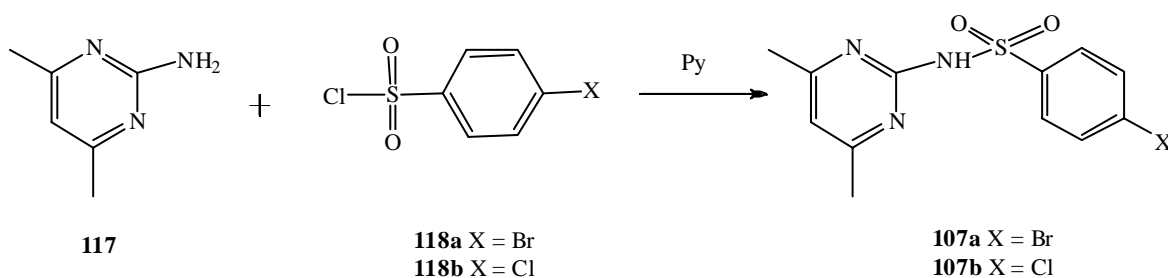
Edellä suojattu fosfaattiaihiolääke pyrittiin syntetisoimaan liittämällä fosfaattiaihiio-osa DPMBAn (1). Tämä ei kuitenkaan onnistunut useista kokeiluista huolimatta. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen valmistamista kokeiltiin seuraavaksi liittämällä sekundaarinen amiini (108) yhdisteen (107a-b) aromaattiseen renkaaseen metallikatalyyttisesti (Kaavio

31, reaktio IIa). 4-Bromi-*N*-(4,6-dimetyylipirimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi (**107a**) ja 4-kloori-*N*-(4,6-dimetyylipirimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi (**107b**) voitaisiin valmistaa 2-amino-4,6-dimetyylipirimidiinistä (**117**) ja 4-bromibentseenisulfonyylikloridista tai 4-klooribentseenisulfonyylikloridista (**118a-b**) kirjallisuusmenetelmällä (Kaavio 31, reaktio IIb)²⁰³. Sekundaarisen amiinin (**108**) synteesiä tutkittiin 2-metyylibentsyyliamiinin (**119**) ja fosfaattiaiho-osan (**106a**) S_N2-reaktiolla.



Kaavio 31. Synteesistrategia II suojatun fosfaattiaihiolääkkeen valmistamiseksi (Kaavio 27, II).

6.2.2. 4-bromi-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin ja 4-kloori-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin synteesi



Kaavio 32. 4-bromi-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin (**107a**) ja 4-kloori-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin (**107b**) synteesi (Kaavio 31, IIb).

Yhdisteet (**107a-b**) valmistettiin 2-amino-4,6-dimetyylipyrimidiinistä (**117**) ja 4-bromibentseenisulfonyylikloridista (**118a**) tai 4-klooribentseenisulfonyylikloridista (**118b**) (Kaavio 31, IIb). Lähtöaine (**117**) (1 ekv.) liuotettiin pyridiiniin jäähauteessa (Kaavio 32). Lähtöaineet (**118a**) tai (**118b**) (1,5 ekv.) liuotettiin myös pyridiiniin, ja liuos lisättiin hitaasti edellisen seoksen joukkoon. Reaktioseokseen lisättiin vesi, jolloin raakatuote kiteytyi. Uudelleenkiteytysten (MeOH:sta ja DCM:sta) jälkeen tuotteet (**107a**) ja (**107b**) saatiin eristettyä (37-39 ja 26 %).

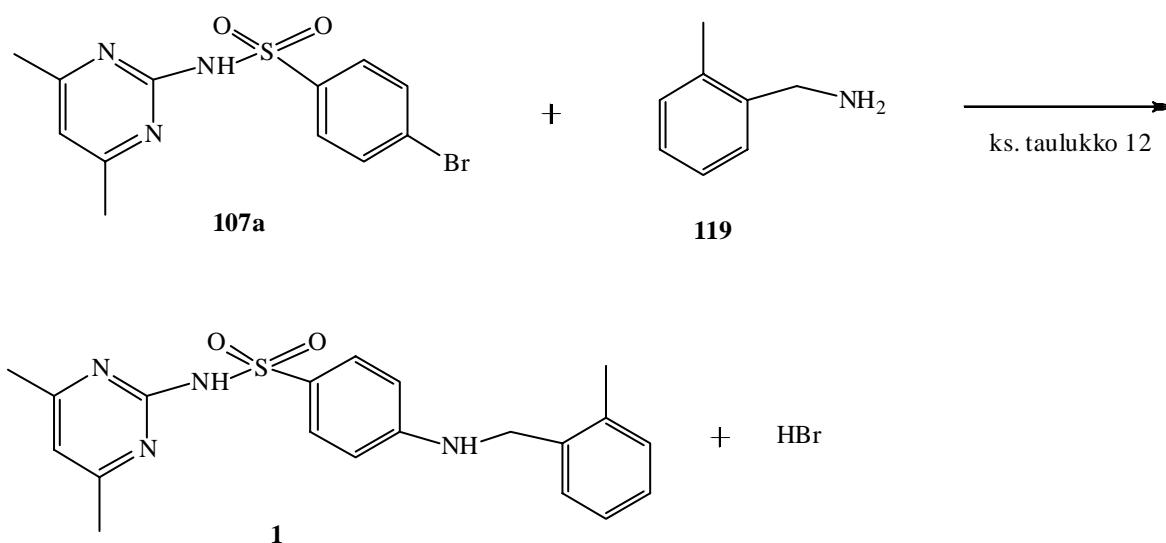
Tuotteiden (**107a**) ja (**107b**) lopulliset saannot eivät olleet kovin hyviä, lisäksi tuotteen (**107b**) kiteytyminen kesti huoneenlämpötilassa useita vuorokausia. Saantoja voisi pyrkiä parantamaan kokeilemalla muita puhdistusmenetelmiä. Kirjallisuudessa tuotteen (**107b**) saanto oli 54 %²⁰³.

6.2.3. Amiinin liittäminen aromaattiseen renkaaseen

Primaarisen amiinin (**119**) liittämistä aromaattiseen renkaaseen kokeiltiin sekä Ullmannin reaktiolla että palladiumin avulla. Primaarisen amiinin käyttö ei kuulunut alkuperäiseen synteestrategiaan II (Kaavio 31, IIa), mutta reaktion onnistuessa menetelmää voisi laajentaa sekundaarisen amiinin (**108**) ja yhdisteiden (**107a-b**) reaktioon.

Ullmannin reaktio

Saksalainen kemisti Fritz Ullmann esitti v. 1901 reaktion, jossa lähtöaineina käytetään kaksi ekvivalenttia aryylihalidia ja yksi ekvivalentti kuparia²⁰⁴. Reaktio tehdään korkeassa lämpötilassa (> 200 °C), ja lopputuotteena muodostuu symmetrinen tai ei-symmetrinen biaryyli sekä kuparihalidia^{204,205}. Ullmannin reaktiosta on olemassa lukuisia sovelluksia. Yksi tyypillinen Ullmannin reaktio on kuparijodidin (CuI) avulla tehtävä kytkentäreaktio aryylihalidin ja amiinin välillä hiili-typpi -sidoksen muodostamiseksi. Ullmannin reaktioita kokeiltiin kirjallisuudessa esitettyjä menetelmiä mukailien (Kaavio 33, Taulukko 12).^{205,206}



Kaavio 33. Primaarisen amiinin (**119**) liittäminen aromaattiseen renkaaseen.

Ullmannin reaktiossa 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (1 ekv.) liuotettiin kuivaan DMF:iin, ja liuos lisättiin argonsuojakaasun alla olevan yhdistettä (**107a**) (1 ekv.), kaliumkarbonaattia (K₂CO₃) (2,5 ekv.) ja kuparia sisältävän seoksen joukkoon. Reaktioita tehtiin samanaikaisesti neljä, jolloin kuparia kokeiltiin neljässä eri muodossa (Taulukko 12, rivi 1). Kyseessä oli joko alkuainekupari (1 ekv.), CuI (0,1 ekv.), kupari(I)kloridi (CuCl) (1 ekv.) tai kupari(II)kloridi (CuCl₂) (1 ekv.). Reaktioita sekoitettiin lämpötilassa 100 °C neljän vuorokauden ajan ja lopuksi todettiin, ettei lopputuotetta eli DPMBa:ta (**1**) muodostunut.

Taulukko 12. Reaktioissa käytetyt olosuhteet.

| | Cu/Pd(II) | Ekv. | Ligandi | Ekv. | Emäs | Ekv. | Liutotin |
|----------------------|--------------------------|-------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|-----------------|
| 1^a | Cu | 1 | - | - | K ₂ CO ₃ | 2,5 | DMF |
| | CuI | 0,1 | - | - | | | |
| | CuCl | 1 | - | - | | | |
| | CuCl ₂ | 1 | - | - | | | |
| 2^b | CuI | 0,1 | - | - | K ₂ CO ₃ | 2,5 | DMF |
| 3^c | Pd(OAc) ₂ | 0,05 | dppe tai dppf | 0,1 | NaOMe | 1,1 | Toluene |
| 4^d | Pd(OAc) ₂ | 0,01 | dppe | 0,02 | NaOMe | 1,4 | DME |
| 5^e | Pd(OAc) ₂ tai | 0,05 | dppe tai | 0,1 | Cs ₂ CO ₃ | 1,5 | DME tai |
| | Pd(dba) ₂ | 0,01 | dppf | 0,02 | | | Toluene |

^a100 °C, argon^bMW (180 °C, 20 min)^c110 °C^dMW (180 °C/150 °C, 20 min)^e120 °C, argon

Reaktiota kokeiltiin myös mikroaaltoreaktorissa (Taulukko 12, rivi 2), koska neljän vuorokauden sekoittaminen lämpötilassa 100 °C ei saanut reaktioita etenemään. Mikroaaltoreaktoriin valittiin CuI, koska sitä sisältävästä reaktioseoksesta oli havaittu tuotetta ohutkerroskromatografian (TLC) avulla. TLC-levyjen tulkinta osoittautui hankalaksi, sillä liuottimena käytetty DMF näkyi TLC-levyillä ja vaikeutti tulkintaa. Luotettavan tuloksen saamiseksi reaktion edistymistä tarkasteltiin myös kaasukromatografian (GC) avulla selvittämällä ensin lähtöaineena käytetyn 2-metyyli-bentsyyliamiinin (**119**) retentioaika, ja tarkastelemalla tämän jälkeen reaktioseoksista otettuja näytteitä. Reaktio ei tapahtunut.

Palladiumreaktiot

Palladiumkatalysoitua reaktiota aryylihalidin ja amiinin välillä hiili-typpi -sidoksen muodostamiseksi kutsutaan Buchwald-Hartwigin kytKentäreaktioksi. Siinä katalyyttinä

toimiva palladium kompleksoituu fosfiini-tyyppisen ligandin kanssa. Emästä käytetään stoikiometrinen määrä.^{205,207,208}

Primaarisen amiinin (**119**) liittämistä yhdisteen (**107a**) aromaattiseen renkaaseen kokeiltiin kuparin lisäksi palladiumin avulla kirjallisuudessa esitettyjä menetelmiä mukailten (Kaavio 33, Taulukko 12, rivit 3-5)²¹¹⁻²¹⁶.

Palladium(II)asetatti ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) (0,05 ekv.) ja ligandina toimiva etyleenibis(difenyylifosfiini) (dppe) (0,1 ekv.) tai 1,1'-bis(difenyylifosfiino)ferroseeni (dppf) (0,1 ekv.) liuotettiin kuivaan tolueniin ja seosta refluksoitettiin (Taulukko 12, rivi 3). Yhdiste (**107a**) (1 ekv.) ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (1 ekv.) liuotettiin kuivaan tolueniin, ja liuos lisättiin refluksoituvan seoksen joukkoon. Lopuksi lisättiin NaOMe (1,1 ekv.), ja seosta refluksoitettiin yön yli. DPMBA:ta (**1**) ei muodostunut.

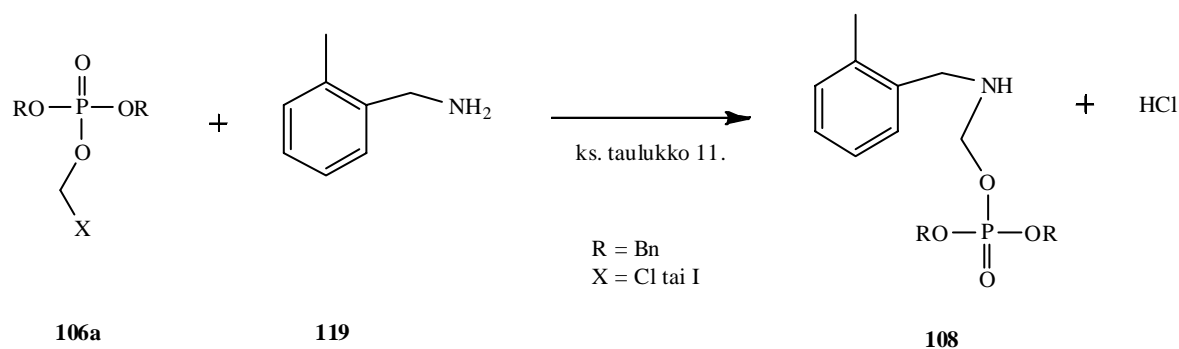
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,01 ekv.), dppe (0,02 ekv.), yhdiste (**107a**) (1 ekv.) ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (1,2 ekv.) liuotettiin kuivaan dimetoksietaniin (DME) ja lopuksi lisättiin NaOMe (1,4 ekv.) (Taulukko 12, rivi 4). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa, mutta DPMBA:ta (**1**) ei muodostunut.

Lopuksi reaktioita tehtiin rinnakkain kahdeksan, jolloin palladiumia kokeiltiin kahdessa eri muodossa, ligandeja ja liuottimia oli myös kaksi erilaista (Taulukko 12, rivi 5). Emäksenä toimi kaikissa reaktiossa Cs_2CO_3 . Yhdiste (**107a**) (1 ekv.) ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (1,2 ekv.) liuotettiin käytettävään liuottimeen. Liuos lisättiin argonsuojakaasun alla olevaan seokseen, joka sisälsi $\text{Pd}(\text{OAc})_2$:ia (0,05 ekv.) tai bis(dibentsylideeniasetoni)palladium(0) ($\text{Pd}(\text{dba})_2$) (0,01 ekv.), Cs_2CO_3 :ia (1,5 ekv.) ja ligandia. Ligandina toimi joko dppe tai dppf (0,1 ekv. tai 0,02 ekv.). Reaktioita sekoitettiin lämpötilassa 120 °C neljän vuorokauden ajan, mutta DPMBA:ta (**1**) ei muodostunut.

TLC-levyillä näkyi joissakin kokeiluissa mahdollisesta tuotteesta kertova täplä. Täplän R_f -arvo ei kuitenkaan ollut yhtenevä DPMBA:n (**1**) R_f -arvon kanssa. GC:iaa käytettiin reaktioiden seurantaan TLC:n rinnalla.

6.2.4. Fosfaattiaihio-osan liittäminen primaariseen amiiniin

Fosfaattiaihio-osan (**106a**) ja 2-metyylibentsyyliamiiniin (**119**) välistä reaktiota tutkittiin eri emäksillä (Kaavio 34). Liitettäessä näin saatava sekundaarinen amiini bentseenisulfonamidin (**107a-b**) aromaattiseen renkaaseen muodostuu lopputuotteena tavoiteltu suojattu fosfaattiaihiolääke.



Kaavio 34. Reaktio fosfaattiaihiio-osan (**106a**) ja 2-metyylibentsyyliamiinin (**119**) välillä (Kaavio 31, IIc).

Taulukko 13. Reaktio-olosuhteet.

| | Emäs | Ekv. | Liutotin |
|----------|---|-------------|-----------------|
| 1 | Cs ₂ CO ₃ , | 1,2 | DMF |
| | K ₂ CO ₃ , | 1,2 | |
| | PEMP tai | 1,2 | |
| | ei emästä | | |
| 2 | K ₂ CO ₃ , | 1,2 | THF |
| | PEMP, | 1,2 | |
| | NaH, | 3 + 3 | |
| | Ag ₂ O tai | 3 | |
| | ei emästä | | |
| 3 | NaH | 6 + 2 | THF |
| 4 | Cs ₂ CO ₃ (argon) | 1,2 | DMF |

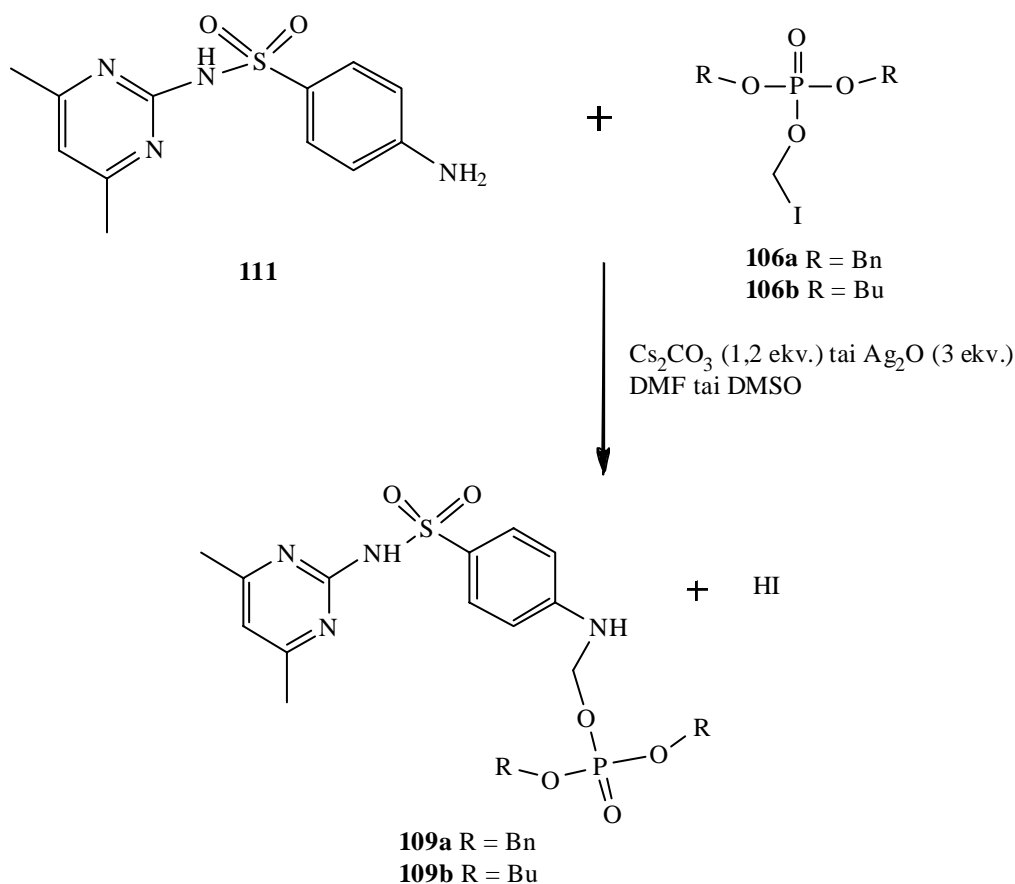
Mahdollinen emäs ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin tai THF:iin (Kaavio 34). Emäksinä toimivat Cs₂CO₃ (1,2 ekv.), K₂CO₃ (1,2 ekv.), 1,2,2,6,6-pentametyylipiperidiini (PEMP) (1,2 ekv.), NaH (6 ekv. tai 8 ekv.) tai Ag₂O (3 ekv.) (Taulukko 13, rivit 1-4). Reaktioita kokeiltiin myös ilman emästä (Taulukko 13, rivit 1-2). Seoksen joukkoon lisättiin fosfaattiaihiio-osa (**106a**) (R=Bn, X=Cl tai I) (1-1,2 ekv.), ja reaktioita sekoitettiin huoneenlämpötilassa tai refluksoitettiin yön yli. Yhtä reaktiota

(emäksenä Cs_2CO_3) kokeiltiin myös argonsuojakaasun alla (Taulukko 13, rivi 4). GC:n perusteella todettiin, että reaktiota, jossa emäksenä toimi NaH, kannatti kokeilla suuremmalla ainemäärällä (Taulukko 13, rivi 3). Raakatuotteet puhdistettiin pylväskromatografisesti.

Lopputuotteita tarkasteltiin NMR:n avulla. ^1H NMR-spektrien perusteella eristetyt yhdisteet eivät olleet haluttua lopputuotetta (**108**). Spektrien perusteella osa fraktioista ei ole kumpikaan synteesin lähtöaineista. Reaktioissa muodostui rakenteeltaan osittain halutun lopputuotteen kaltaista yhdistettä (13 mg). Toinen bentsyyliuojaryhmistä on kuitenkin irronnut bentsyylialkoholina. Lisäksi muodostui yhdistettä (6 mg), josta bentsyyliiryhmä on myös irronnut bentsyylialkoholina ja fosfori lähtee suoraan amiinin tyypestä eli fosfaattiaihiio-osan (**106a**) linkkeri on hajonnut.

6.3. SYNTEESISTRATEGIA III

Synteesistrategiassa I kumpaakaan fosfaattiaihiio-osaa (**106a-b**) ei saatu liitettyä DPMBAn (**1**) sekundaariseen aminoryhmään. Suojattua fosfaattiaihiolääkettä ei myöskään onnistuttu syntetisoimaan strategian II mukaan useiden reaktioiden kautta. Seuraavaksi valittiin lähestymistapa, jossa fosfaattiaihiio-osa pyrittiin liittämään DPMBAn synteesissä lähtöaineena käytetyn sulfametasiinin (**111**) primaariseen aminoryhmään (Kaavio 27, reitti III). Tämän jälkeen tarkoituksena oli liittää 2-metyylibentsyylibromidi (**110**) muodostuneen molekyylin sekundaariseen aminoryhmään, jolloin lopputuotteena saataisiin tavoiteltu suojattu fosfaattiaihiolääke. Synteeseissä fosfaattiaihiio-osien kloori korvattiin jodilla käsittelemällä niitä ensin NaI:lla.



Kaavio 35. Reaktio dibentsyyli- tai dibutyyljodimetyylifosfaatin (**106a-b**) ja sulfametatsiinin (**111**) välillä (Kaavio 27, III).

Sulfametatsiini (**111**) (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin ja Cs_2CO_3 (1,2 ekv.) lisättiin koko ajan sekoittaen (Kaavio 35). Fosfaattiaihiio-osat (**106a-b**) (1 ekv.) ja NaI (1,2 ekv.) liuotettiin asetoniin, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostunut dibentsyyli- tai dibutyyljodimetyylifosfaatti liuotettiin DMF:iin, ja liuos lisättiin sulfametatsiinia (**111**) ja Cs_2CO_3 :ia sisältävän seoksen joukkoon. Raakatuotteet puhdistettiin pylväskromatografisesti.

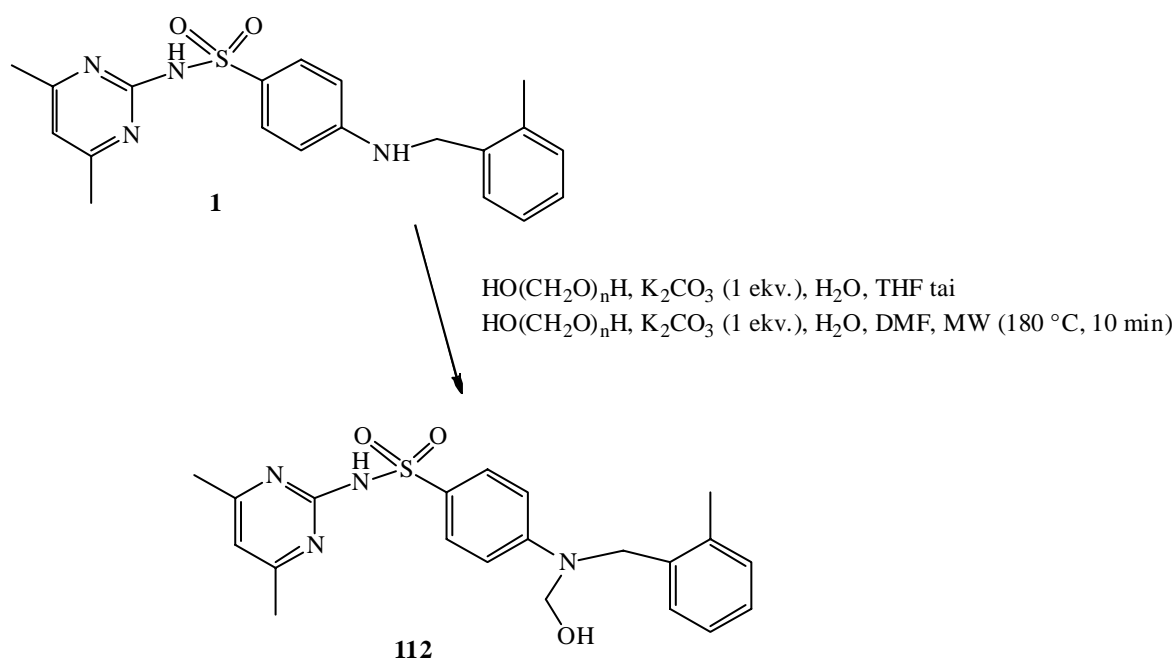
^1H NMR-spektrien perusteella eristetyt yhdisteet eivät olleet haluttua lopputuotetta (**109a-b**). Spektrien perusteella kyseessä ei ole kumpikaan synteessin lähtöaineista. Reaktiossa, jossa lähtöaineena oli dibentsyylijodimetyylifosfaatti (**106a**), muodostui yhdistettä (58 mg), jossa osittain hajonnut fosfaattiaihiio-osa (**106a**) on liittynyt sulfametatsiinin (**111**) primaariseen tyyppiin. Reaktiossa, jossa lähtöaineena oli dibutyyljodimetyylifosfaatti (**106b**), muodostui yhdistettä (40 mg), joka ei myöskään ollut haluttu lopputuote. Spektrissä on nähtävissä fosfaattiaihiio-osan (**106b**) vetyjen antamat signaalit.

Reaktioita kokeiltiin myös korvaamalla edellä käytetty Cs_2CO_3 Ag_2O :lla (3 ekv.) ja käyttämällä liuottimena DMF:n sijaan DMSO:ia. Reaktiot tehtiin samoissa olosuhteissa kuin edellä, mutta ne eivät tapahtuneet.

6.4. SYNTEESISTRATEGIA IV

Kirjallisuudessa on esitetty hydroksimetyyliryhmän liittäminen β -laktaamiin, jolloin muodostuu *N*-hydroksimetyyli- β -laktaami²¹⁷. Hydroksimetyyliryhmän liittämistä DPMBA:han kokeiltiin kirjallisuudessa esitettyä menetelmää mukailien (Kaavio 36). Muodostuneeseen tuotteeseen (**112**) voitaisiin edelleen liittää fosfaattiesteri (**113**).

Reaktiota yritettiin kahdella tavalla. Ensimmäisessä kokeilussa DPMBA (**1**) (1 ekv.) liuotettiin THF:iin. Liuokseen lisättiin paraformaldehydi (1,2 ekv.), K_2CO_3 (1 ekv.) ja vesi. Yön yli refluksionin jälkeenkään tuotetta (**112**) ei muodostunut. Reaktiota kokeiltiin samoilla ainemäärillä myös mikroaaltoreaktorissa, mutta reaktio ei tapahtunut.



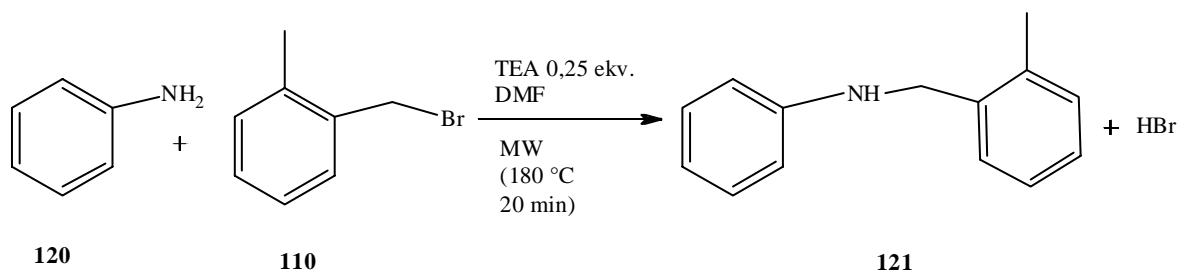
Kaavio 36. Hydroksimetyyliryhmän liittäminen DPMBA:han (**1**).

6.5. PRIMAARISTEN JA SEKUNDAARISTEN AMIINIEN LIITTÄMINEN FOSFAATTIAIHIO-OSAAN

6.5.1. Johdanto

Tavoitteena oli kokeilla rakenteeltaan yksinkertaisten primaaristen ja sekundaaristen amiinien liittämistä fosfaattiaihio-osaan, jotta saataisiin selville, onko vastaava reaktio ylipäänsä mahdollinen DPMBA:n (**1**) kohdalla. Fosfaattiaihio-osan kloori korvattiin ensin

jodilla käsittelemällä fosfaattaihio-osaa NaI:lla. Primaarisiksi amiineiksi valittiin aniliini (**120**), bentsyyliamiini (**122**) ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**). Ne ovat yksinkertaisia, helposti saatavilla olevia bentseenirenkaan sisältäviä primaarisia amiineja. Sekundaarinen amiini, *N*-(2-metyylibentsyyli)aniliini (**121**), valmistettiin itse. Sen synteesi on kuvattu kirjallisuudessa²¹⁸, mutta tässä työssä synteesissä sovellettiin samaa menetelmää kuin DPMBAn (**1**) valmistuksessa (Kaavio 37).

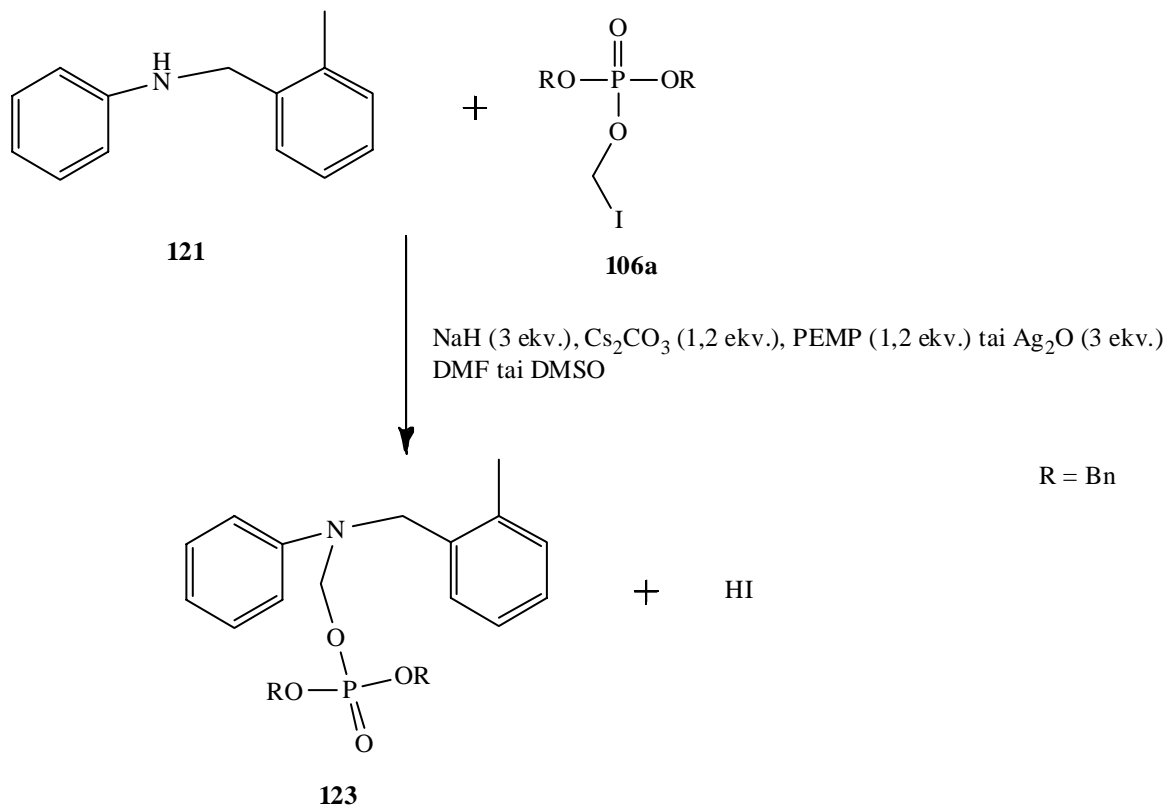


Kaavio 37. Reaktio 2-metyylibentsyylibromidin (**110**) ja aniliinin (**120**) välillä.

Aniliini (**120**) (1 ekv.), 2-metyylibentsyylibromidi (**110**) (1 ekv.) ja TEA (0,25 ekv.) liuotettiin DMF:iin. Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa, ja raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. *N*-(2-metyylibentsyyli)aniliinin (**121**) saanto oli hyvä (82 %). Kirjallisuudessa sen saannoksi on esitetty 70 %²¹⁸, joten mikroaaltoreaktorin käyttö parantaa saantoa.

6.5.2 Fosfaattaihio-osan liittäminen sekundaariseen amiiniin

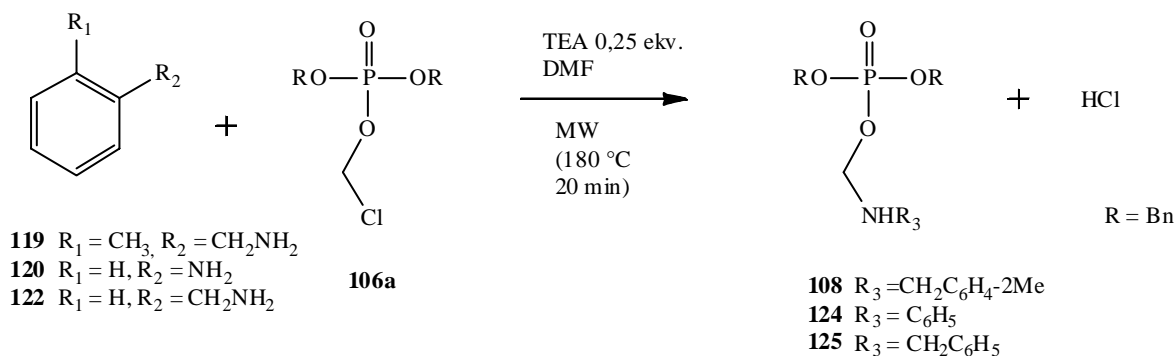
Reaktioita tehtiin rinnakkain neljä, jolloin kokeiltiin eri emäksiä ja kahta eri liuotinta. Sekundaarinen amiini (**121**) (1 ekv.) liuotettiin DMF:iin tai DMSO:iin (Kaavio 38). DMSO:ia sisältävään reaktioastiaan lisättiin Ag₂O (3 ekv.) ja kolmeen DMF:ia sisältävään reaktioastiaan lisättiin kokeiltava emäs eli NaH (3 ekv.), Cs₂CO₃ (1,2 ekv.) tai PEMP (1,2 ekv.) ja sekoitettiin. Fosfaattaihio-osa (**106a**) (1,2 ekv.) ja NaI (1,2 ekv.) liuotettiin asetoniin, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostunut dibentsyylijodidimetyylifosfaatti liuotettiin käytettävään liuottimeen, ja liuos lisättiin sekundaarista amiinia (**121**) ja emästä sisältävän seoksen joukkoon. Lopuksi todettiin, ettei tuotetta (**123**) muodostunut.



Kaavio 38. Reaktio dibentsyylijodimetyyli fosfaatin (**106a**) ja sekundaarisen amiinin (**121**) välillä.

6.5.3. Fosfaattiaihio-osan liittäminen primaariseen amiiniin

Reaktiossa kokeiltiin kolmea eri primaarista amiinia eli 2-metyyli bentsyyliamiinia (**119**), aniliinia (**120**) tai bentsyyliamiinia (**122**). Primaarinen amiini (1 ekv.), fosfaattiaihio-osa (**106a**) (1,2 ekv.) ja TEA (0,25 ekv.) liuotettiin DMF:iin (Kaavio 39). Reaktiot tehtiin mikroaaltoreaktorissa. Reaktiota 2-metyyli bentsyyliamiinin (**119**) kanssa ei tapahtunut. Aniliinia (**120**) sisältäneen reaktioseoksen raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti ja todettiin, ettei reaktiossa muodostunut tavoiteltua lopputuotetta (**123**). ^1H NMR-spektrin perusteella eristetty tuote ei ole kumpikaan käytetyistä lähtöaineista. Mahdollisesti fosfaattiaihio-osa (**106a**) hajosi reaktion aikana. Muodostui kaksi yhdistettä, joista toisessa aniliinin (**120**) tyyppien on liittynyt yksi fosfaattiaihio-osan bentsyyli ryhmä ja toisessa kaksi bentsyyli ryhmää. Kolmannelle reaktiolle, jossa lähtöaineena oli bentsyyliamiini (**122**), ei tehty pylväspuhdistusta.



Kaavio 39. Reaktio primaaristen amiinien (**119, 120, 122**) ja dibentsyylikloorimetyyli-fosfaatin (**106a**) välillä.

7. SYNTEESISTRATEGIOIDEN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

7.1. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

7.1.1. Materiaalit

Työssä käytetyt kaupalliset reagenssit ja liuottimet oli hankittu valmistajilta Acros Organics, Alfa Aesar, Fresenius Kabi, Hüls, Janssen Chimica, J.T. Baker, Merck, Sigma-Aldrich ja VWR International (Liite 1). Käytetyissä TLC-levyissä oli adsorbenttina silikageeli (Silica gel 60 F₂₅₄) ja levyt oli valmistanut Merck. Käytetyn silikageelin (Silica gel 60, partikkelikoko 40-63 µm) valmistaja oli Fluka. Liuottimet kuivattiin tarvittaessa molekyyliseuloilla (3 Å).

7.1.2. Menetelmät

7.1.2.1. Kromatografiset menetelmät

Tuotteiden puhdistuksessa käytettiin pylväskromatografiaa silikageelin ollessa adsorbenttina. Analyyttisenä kromatografisena menetelmänä synteeseissä ja pylväskromatografian yhteydessä oli TLC (adsorbenttina silikageeli). TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa (254 nm) tai levyllä olevat yhdisteet saatiin näkyviin kastamalla levyt Mo₁₂Na₃O₄₀P-värijäysookseen tai vanilliini-liuokseen (7 g/125 ml EtOH, 1,5 ml H₂SO₄) ja kuumentamalla levyjä. Analyyttisenä menetelmänä käytettiin lisäksi GC:ia (Agilent 6850 GC System).

7.1.2.2. Yhdisteiden karakterisointi

Tuotteet karakterisoitiin NMR:n (Bruker Avance 400 tai Bruker Avance 500, 5mm BBO BB-1H) avulla mittaamalla ¹H NMR-, ¹³C NMR- ja ³¹P NMR-spektrit. Mittaukset tehtiin huoneenlämpötilassa. Käytetyt liuottimet olivat CDCl₃ ja DMSO-d₆. Referenssinä

käytettiin liuotimpiikin antamaa kemiallista siirtymää (CDCl_3 (δ 7,26 ppm) ja DMSO (δ 2,50 ppm)). Tuotteiden karakterisointiin käytettiin myös massaspektrometriaa (MS) (Bruker Daltonics micrOTOF_Q). Spektrien analysointiin käytetyt ohjelmat olivat Bruker TOPSPIN (versio 1.2) ja Bruker Compass DataAnalysis (versio 4.0).

7.2. DPMBBA:LLE TEHDYT LIUKOISUUSKOKEET

7.2.1. DPMBBA:n liukoisuus veteen suolamuodossa

DPMBBA:n (**1**) vesiliukoisuutta tutkittiin muodostamalla siitä suola. Tämä tapahtui lisäämällä DPMBBA:ta ja vettä sisältävään seokseen erilaisia happoja. Käytetyt hapot olivat suolahappo (HCl, 37 %), rikkihappo (H_2SO_4 , 95-97 %), etikkahappo (CH_3COOH , 99-100 %), sitruunahappo ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ja fosforihappo (H_3PO_4 , 85 %).

Kokeiluja tehtiin yhteensä 16 kappaletta. DPMBBA (**1**) (40,4 mg; 0,1 mmol) punnittiin lasipulloon, lisättiin vesi (1 ml) ja ravisteltiin. Kuhunkin lasipulloon lisättiin kyseessä olevaa happoa oheisen taulukon mukaisesti (Taulukko 14). Hapon lisäyksen jälkeen ravisteltiin voimakkaasti ja astioiden annettiin seistä huoneenlämpötilassa. Todettiin, ettei liukenemista tapahtunut.

7.2.2. Liukoisuuden parantajana Tween 80

DPMBBA:n (**1**) liukoisuutta fysiologiseen suolaliuokseen tutkittiin vesiliukoisuutta lisäävän polysorbaatti 80:n (Tween 80) avulla. Kokeiluja tehtiin kaksi. Kummassakin kokeilussa kokonaistilavuus oli 5 ml. Sekä lisätyn DMSO:n että Tween 80:n tilavuus kokonaistilavuudesta oli viisi prosenttia. Lopputilavuus (90 %) oli fysiologista suolaliuosta.

Ensimmäisessä kokeilussa DPMBBA (**1**) (10,0 mg; 0,02 mmol) liuotettiin DMSO:iin (250 μl), jolloin sen havaittiin liukenevan täysin. Seokseen lisättiin väriltään keltainen, viskoosi Tween 80 (250 μl) ja lopuksi fysiologinen suolaliuos (4500 μl). Seosta ravisteltiin voimakkaasti, jolloin muodostui samea, runsaasti vaahtoava seos. Sen annettiin seistä huoneenlämpötilassa useita tunteja. DPMBBA (**1**) ei liennut fysiologiseen suolaliuokseen vaan jäi valkoisena sakkana lasipullon pohjalle. Toinen kokeilu oli muuten samanlainen kuin edellä, mutta DPMBBA:n (**1**) ainemäärä oli puolet pienempi kuin edellä. Myös tässä todettiin, ettei se liennut fysiologiseen suolaliuokseen vaan jäi valkoisena sakkana lasipullon pohjalle.

Taulukko 14. Käytetyt hapot.

| Pullo | Lisätty happo | m (mg) | n (mmol) | Ekv. |
|--------------|--------------------------------|---------------|-----------------|-------------|
| 1 | HCl | 9,8 | 0,27 | 1 |
| 2 | HCl | 19,7 | 0,54 | 2 |
| 3 | HCl | 29,5 | 0,81 | 3 |
| 4 | HCl | 58,3 | 1,60 | 6 |
| 5 | H ₂ SO ₄ | 9,8 | 0,10 | 1 |
| 6 | H ₂ SO ₄ | 20,4 | 0,21 | 2 |
| 7 | H ₂ SO ₄ | 30,7 | 0,31 | 3 |
| 8 | CH ₃ COOH | 6,0 | 0,10 | 1 |
| 9 | CH ₃ COOH | 12,1 | 0,20 | 2 |
| 10 | CH ₃ COOH | 18,1 | 0,30 | 3 |
| 11 | sitruunahappo | 21,0 | 0,10 | 1 |
| 12 | sitruunahappo | 42,0 | 0,20 | 2 |
| 13 | sitruunahappo | 63,0 | 0,30 | 3 |
| 14 | H ₃ PO ₄ | 11,8 | 0,12 | 1 |
| 15 | H ₃ PO ₄ | 23,0 | 0,24 | 2 |
| 16 | H ₃ PO ₄ | 34,6 | 0,35 | 3 |

7.3. SYNTEESISTRATEGIA I

7.3.1. DPMBA

Sulfametatsiini (**111**) (550 mg; 1,83 mmol), 2-metyylibentsyylibromidi (**110**) (331 mg; 1,79 mmol) ja TEA (43,6 mg; 0,43 mmol) liuotettiin DMF:iin (3 ml). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (Personal Chemistry SmithCreator, 20 minuuttia, lämpötila 200 °C tai 180 °C), ja alussa värittömän liuoksen väri muuttui keltaiseksi. Reaktion tapahtuminen varmistettiin TLC:n avulla (ajoliuos 2 % MeOH DCM:ssa). TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, että oli nähtävissä tuotetäplä (R_f -arvo noin 0,70). Liuotin haihdutettiin, ja keltainen nestemäinen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 25x3,5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuksena oli DCM. Tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi

valkoinen kiinteä tuote. DPMBA:n (**1**) saanto oli 543 mg (1,34 mmol; 75 %). Saanto vaihteli synteesistä riippuen välillä 39-75 %.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d; *J* = 8,4 Hz; 2H, arom.); 7,11 (m, 4H, arom.); 6,57 (s, 1H, arom.); 6,55 (d; *J* = 4,4 Hz; 2H, arom.); 5,48 (s, 2H, CH₂); 4,30 (s, 1H, NH); 2,40 (s, 3H, CH₃); 2,28 (s, 6H, CH₃);

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167,20; 158,02 (2C); 150,47; 136,50; 135,32; 131,75 (3C); 129,90; 126,82; 126,50; 125,77; 114,26; 112,83 (2C); 47,24 (CH₂); 23,64 (2C, CH₃); 19,35 (CH₃);

MS (ESI⁺): [M+Na]⁺ (C₂₀H₂₂N₄O₂S) *m/z* havaittu (laskettu): 405,1367 (405,1361)

7.3.2. DPMBA:n synteesi vaihtoehtoisilla tavoilla

Sulfametatsiini (**111**) (183 mg; 0,61 mmol), 2-metyyli-bentsyylibromidi (**110**) (110 mg; 0,59 mmol) ja Cs₂CO₃ (238,5 mg; 0,73 mmol) liuotettiin DMF:iin tai 2-MeTHF:iin (1 ml). Cs₂CO₃ ei liennut täysin orgaaniseen liuottimeen. Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 200 °C), jolloin alussa värittömän liuoksen väri muuttui tumman verenpunaiseksi. Reaktion tapahtumista tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena DCM). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, ettei reaktio tapahtunut, sillä reaktioseoksesta TLC-levylle applikoidussa näytteessä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät. 2-MeTHF:n toimiessa liuottimena paine mikroaaltoreaktorissa nousi viiden minuutin kuluttua yli turvarajan (20 bar), ja laite ilmoitti koeputken särkyneen laitteen sisään.

7.3.3. Dibentsyylikloorimetyylifosfaatti

Dibentsyylifosfaatti (**114a**) (1,32 g; 4,76 mmol), NaHCO₃ (1,60 g; 19,04 mmol) ja *n*-Bu₄NHSO₄ (0,1616 g; 0,476 mmol) liuotettiin veteen (40 ml). Lisättiin DCM (25 ml), ja seosta sekoitettiin jäähauteessa 10 minuuttia. Tämän jälkeen joukkoon lisättiin hitaasti kloorimetyylidikloorisulfaatti (**115**) (0,94 g; 5,7 mmol) liuotettuna DCM:iin (15 ml). Jäähaude poistettiin, ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion tapahtuminen varmistettiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasettiin ja heksaanin seos (1:1, v/v)). TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, että tuotetäplä oli nähtävissä (R_F-arvo noin 0,80).

Orgaaninen faasi erotettiin, ja sitä pestiin kerran kylläisellä suolaliuoksella (brine) (10 ml) sekä kuivattiin (Na₂SO₄). Kuivausaine suodatettiin pois, liuotin haihdutettiin ja keltainen nestemäinen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun

silikageelipylvään mitat noin 20x3,5 cm). Ajoliuoksena pylväskromatografiassa oli etyyliasettiin ja heksaanin seos (1:3, v/v). Tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi vaaleankeltainen nestemäinen tuote. Dibentsyylikloorimetyylifosfaatin (**106a**) saanto oli 1,28 g (3,9 mmol; 82 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29 (s, 10H, arom.); 5,55 (d, 2H, CH_2); 5,03 (d, 4H, CH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 135,20 (2C); 128,78 (4C); 128,66 (2C); 128,08 (4C); 73,54; 69,89 (2C);

$^{31}\text{P-NMR}$ (161 MHz, CDCl_3) δ -2,17

7.3.4. Dibutylikloorimetyylifosfaatti

Dibutyylifosfaatti (**114b**) (1,00 g; 4,76 mmol), NaHCO_3 (1,60 g; 19,04 mmol) ja $n\text{-Bu}_4\text{NHSO}_4$ (0,1616 g; 0,476 mmol) liuotettiin veteen (40 ml). Lisättiin DCM (25 ml), ja seosta sekoitettiin jäähauteessa 10 minuuttia. Tämän jälkeen joukkoon lisättiin hitaasti kloorimetyylifosfaatti (**115**) (0,94 g; 5,7 mmol) liuotettuna DCM:iin (15 ml). Jäähaude poistettiin, ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktio tapahtuminen varmistettiin TLC:n avulla (ajoliuoksena MeOH:n ja DCM:n seos (4:6, v/v)). TLC-levyt värjättiin vanilliini-liuoksella ja kuumennettiin, jolloin havaittiin tuotetäplä (R_f -arvo noin 0,80).

Orgaaninen faasi erotettiin ja sitä pestiin kerran kylläisellä suolaliuoksella (brine) (10 ml) sekä kuivattiin (Na_2SO_4). Kuivausaine suodatettiin pois, liuotin haihdutettiin ja väritön nestemäinen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 20x3,5 cm). Ajoliuoksena pylväskromatografiassa oli MeOH:n ja DCM:n seos (2:8, v/v). Tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi heikosti vaaleankeltainen, lähes väritön, nestemäinen tuote. Dibutylikloorimetyylifosfaatin (**106b**) saanto oli 917 mg (3,5 mmol; 74 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (d, 2H); 4,06 (m, 4H, CH_2); 1,64 (m, 4H, CH_2); 1,37 (m, 4H, CH_2); 0,89 (t, 6H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 73,50; 68,23 (2C); 32,07 (2C); 18,54 (2C); 13,48 (2C);

$^{31}\text{P-NMR}$ (161 MHz, CDCl_3) δ -2,22

7.3.5. Suojatun fosfaattihiolääkkeen synteesi NaH:n toimiessa emäksenä

DPMBA (**1**) (100 mg; 0,25 mmol) liuotettiin DMF:iin (10 ml) ja lisättiin NaH (30 mg; 1,25 mmol). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 45 minuuttia. Dibentsyylikloorimetyylifosfaatti (**106a**) (115 mg; 0,35 mmol) liuotettiin DMF:iin (5 ml), ja liuos lisättiin hitaasti joukkoon. Sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa, ja reaktioastia suojattiin kosteuden vaikutukselta CaCl₂-putkella. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksena DCM), ja levy analysoitiin UV-valossa. Kun reaktio oli sekoittunut 2,5 tuntia, TLC-levyllä oli nähtävissä mahdollinen tuotetäplä. Reaktioseokseen lisättiin DCM (30 ml) ja tislattu vesi (15 ml). Tämän jälkeen kerrosten annettiin erottua yön yli.

Erotussuppilossa oli kolme kerrosta, joista ylimpänä väritön vesifaasi, keskellä vaaleankeltainen sakkainen faasi ja alimpana keltainen orgaaninen faasi. Alin orgaaninen faasi erotettiin, sitä pestiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella ja kylläisellä suolaliuoksella (brine) (2x10 ml) sekä kuivattiin (Na₂SO₄). Kuivausaine suodatettiin pois, liuottimet haihdutettiin, ja keltainen nestemäinen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 10x2,5 cm). Ajoliuoksina pylväskromatografiassa olivat dietyylieetteri ja 5 % MeOH DCM:ssa. Ne fraktiot, joista näkyi TLC-levyllä täplä, haihdutettiin kuiviin. Jäljelle jäi fraktiosta riippuen joko väritön tai keltainen nestemäinen jäännös tai kellertävä tai valkoinen kiinteä jäännös. ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektrien perusteella kyseessä ei ollut haluttu lopputuote (**116a**).

Reaktio tehtiin uudelleen samoilla ainemäärillä käyttämällä toisena lähtöaineena dibutyylidikloorimetyylifosfaattia (**106b**). Sen kloori korvattiin ensin jodilla sekoittamalla DMF:ssa NaI:n (48,6 mg; 0,32 mmol) läsnä ollessa. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksina etyyliasetaatin ja heksaanin seokset (1:2 ja 1:1, v/v)). Ennen levyllä applikointia näytteen joukkoon tiputettiin pisara EtOH:ia NaH:n neutraloimiseksi. Levyt värjättiin vanilliini-värjäyksellä ja niitä kuumennettiin. Reaktio ei tapahtunut. Tämän vuoksi seosta refluksoitettiin viikonlopun yli, mutta tavoiteltua tuotetta (**116b**) ei muodostunut.

7.3.6. Suojatun fosfaattihiolääkkeen synteesi KF:n toimiessa emäksenä

DPMBA (**1**) (100 mg; 0,25 mmol) liuotettiin DMF:iin (10 ml) ja joukkoon lisättiin KF (115 mg; 2,0 mmol) koko ajan sekoittaen. Reaktioastia suojattiin kosteuden vaikutukselta CaCl₂-putkella. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 45 minuuttia.

Dibentsyylikloorimetyylifosfaatti (**106a**) (106 mg; 0,32 mmol) ja NaI (48,6 mg; 0,32 mmol) liuotettiin DMF:iin (5 ml,) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 30 minuuttia. Näin muodostunut dibentsyylijodimetyylifosfaatti lisättiin hitaasti DPMBA:ta (**1**) ja KF:a sisältävän seoksen joukkoon, ja sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksena 2 % MeOH DCM:ssa). Levyt värjättiin vanilliinilla tai Mo₁₂Na₃O₄₀P-värjäysliuoksella ja niitä kuumennettiin. TLC-levyjen perusteella reaktiota ei näyttänyt tapahtuvan, joten sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa yön yli.

Yön yli sekoittuneen reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin seos (1:2, v/v)). Reaktio ei näyttänyt tapahtuvan, joten sen tekemistä kokeiltiin mikroaaltoreaktorissa. Reaktioseoksesta otettiin näyte, jota pidettiin mikroaaltoreaktorissa ensin viisi minuuttia lämpötilassa 180 °C (maksimipaine 3,8 baaria). Viiden minuutin kuluttua liuos oli edelleen väritön, ja TLC-levyn perusteella todettiin, ettei reaktio tapahtunut. Reaktio toistettiin, nyt lämpötilassa 200 °C (maksimipaine 7,0 baaria). TLC-levyn perusteella todettiin, ettei tavoiteltua tuotetta (**116a**) muodostunut, sillä reaktioseoksesta TLC-levylle aplikoiduissa näytteissä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät.

Reaktio tehtiin uudelleen samoilla ainemäärillä, nyt toisena lähtöaineena oli dibutyylidikloorimetyylifosfaatti (**106b**). Tässä tapauksessa reaktioseosta refluksoitiin yön yli ja sen edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin seos (1:2, v/v)). Reaktiota kokeiltiin myös mikroaaltoreaktorissa, tavoiteltua tuotetta (**116b**) ei muodostunut.

7.3.7. Suojatun fosfaattiaihiolääkkeen synteesi Ag₂O:n toimiessa emäksenä

DPMBA (**1**) (100 mg; 0,25 mmol) liuotettiin asetonitriiliin (10 ml) ja joukkoon lisättiin Ag₂O (172 mg; 0,74 mmol) koko ajan sekoittaen. Ag₂O värjäsi seoksen tummaksi. Reaktioastia suojattiin kosteuden vaikutukselta CaCl₂-putkella. Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 45 minuuttia.

Fosfaattiaihiio-osa (**106a**) (106 mg; 0,32 mmol) ja NaI (48,6 mg; 0,32 mmol) liuotettiin asetonitriiliin (5 ml), ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 30 minuuttia. Näin muodostunut dibentsyylijodimetyylifosfaatti lisättiin hitaasti DPMBA:ta ja Ag₂O:ia sisältävän seoksen joukkoon, ja sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin

seos (1:1, v/v)), ja levyt analysoitiin UV-valossa. Reaktio ei näyttänyt tapahtuvan, joten sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa yön yli.

Yön yli sekoittuneen reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla. Reaktio ei tapahtunut, joten sitä sekoitettiin ensin lämpötilassa 60 °C. Koska reaktio ei näyttänyt tapahtuvan, reaktioseosta refluksoitiin tunnin ajan ja reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla. Todettiin, ettei reaktio tapahtunut, joten sitä kokeiltiin myös mikroaaltoreaktorissa ensin viisi minuuttia lämpötilassa 150 °C (maksimipaine 8,5 baaria). Viiden minuutin kuluttua alussa tumman liuoksen väri oli muuttunut kellanruskeaksi. TLC-levyn perusteella reaktiota ei tapahtunut. Reaktio toistettiin, nyt lämpötilassa 160 °C (maksimipaine 10,6 baaria). TLC-levyn perusteella tavoiteltua tuotetta (**116a**) ei muodostunut, sillä reaktioseoksesta TLC-levylle applikoidussa näytteessä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät.

7.4. SYNTEESISTRATEGIA II

7.4.1. 4-bromi-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi ja

4-kloori-N-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidi

2-Amino-4,6-dimetyylipyrimidiini (**117**) (500 mg; 4,06 mmol) liuotettiin pyridiiniin (2 ml) jäähauteessa. 4-Bromibentseenisulfonyylikloridi (**118a**) (1,57 g; 6,09 mmol) liuotettiin pyridiiniin (1,5 ml) ja lisättiin hitaasti edellisen seoksen joukkoon. Väriiltään oranssia seosta sekoitettiin jäähauteessa kaksi tuntia. Reaktion tapahtuminen varmistettiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetatiin ja heksaanin seos (1:1, v/v)). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa, jolloin havaittiin tuotteesta kertova täplä (R_f -arvo noin 0,50).

Reaktioseoksen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan. Seokseen lisättiin vesi (25 ml), jolloin raakatuote kiteytyi välittömästi keltaisina kiteinä. Jotta kiteytyminen tapahtuisi mahdollisimman täydellisesti, astia jätettiin huoneenlämpötilaan yön yli. Kiteitä pestiin vedellä (2x20 ml). Raakatuotteen annettiin kuivua kellolasin päällä vetokaapissa.

Raakatuotteesta otettiin näyte TLC:iaa varten ja loppuosa uudelleenkiteytettiin MeOH:sta ja DCM:sta. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, ja seokseen lisättiin tipoitain vettä, jolloin lopputuote kiteytyi. Astia jätettiin huoneenlämpötilaan yön yli. Tuotetta pestiin kylmällä vedellä (2x20 ml) ja valkoisten kiteiden annettiin kuivua kellolasin päällä vetokaapissa. Lopputuotteen puhtautta tarkasteltiin applikoimalla TLC-levylle näytteet raakatuotteesta ja lopputuotteesta (ajoliuoksena etyyliasetatiin ja heksaanin seos (1:1, v/v)). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, että raakatuotteesta oli

levyllä nähtävissä kaksi täplää (R_f -arvot noin 0,50 ja 0,80) ja lopputuotteesta yksi täplä (R_f -arvo noin 0,50). 4-Bromi-*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin (**107a**) saanto oli 519 mg (1,52 mmol; 37 %). Saanto vaihteli synteestistä riippuen välillä 37-39 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7,89 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H, arom.); 7,75 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H, arom.); 6,75 (s, 1H); 2,25 (s, 6H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 168,45 (3C); 138,75; 131,65 (2C); 130,50 (2C); 128,63 (2C); 115,17; 23,54 (2C, CH_3)

Tuotteen (**107b**) synteesi tehtiin samoilla ainemäärillä ja vastaavalla tavalla kuin edellä on kuvattu, toisena lähtöaineena oli 4-klooribentseenisulfonyylikloridi (**118b**). Raakatuote kiteytyi vasta usean vuorokauden kuluttua huoneenlämpötilassa. 4-Kloori-*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)bentseenisulfonamidin (**107b**) (vaaleanpunertavat kiteet) saanto oli 323 mg (1,08 mmol; 26 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7,96 (d; $J = 8,4$ Hz; 2H, arom.); 7,61 (d; $J = 8,4$ Hz; 2H, arom.); 6,74 (s, 1H); 2,25 (s, 6H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 168,43 (3C); 139,83; 138,40; 130,42 (2C); 128,63 (2C); 115,81; 23,53 (2C, CH_3)

7.4.2. Ullmannin reaktio

Reaktiot tehtiin 12-paikkaisessa karusellissa (Radleys Discovery Technologies, CarouselTM). Karusellin ominaisuuksiin kuuluvat lämpötilan säätö ja mahdollisuus inertin kaasun syöttöön. Reaktioita voidaan tehdä rinnakkain useita. Työssä reaktioita tehtiin rinnakkain neljä, jolloin samalla kertaa oli mahdollista kokeilla kuparia neljässä eri muodossa. 2-Metyylibentsyyliamiini (**119**) (36 mg; 0,3 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (2 ml), ja liuos lisättiin argonsuojakaasun alla olevan yhdistettä (**107a**) (103 mg; 0,3 mmol), K_2CO_3 :ia (104 mg; 0,75 mmol) ja kuparia sisältävän seoksen joukkoon. Kupari oli joko alkuainekuparia (19 mg; 0,3 mmol), CuI :ia (5,7 mg; 0,03 mmol), CuCl :ia (30 mg; 0,3 mmol) tai CuCl_2 :ia (40 mg; 0,3 mmol). CuCl_2 oli alun perin kidevedellistä, josta kidevesi oli poistettu pitämällä sitä lämpökaapissa yön yli. Reaktioita sekoitettiin lämpötilassa 100 °C, ja niiden annettiin sekoittua neljän vuorokauden ajan. Reaktioiden edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksina etyyliasetatin ja heksaanin seokset (1:1, 1:2 ja 1:3, v/v)). TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, että reaktioseoksista levyille applikoiduissa näytteissä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät.

Toisessa kokeilussa yhdiste (**107a**) (100 mg; 0,3 mmol) ja amiini (**119**) (36 mg; 0,3 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (2 ml), johon lisättiin K_2CO_3 (104 mg; 0,75 mmol) ja CuI (5,7 mg; 0,03 mmol). K_2CO_3 ei liennut täysin orgaaniseen liuottimeen. Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 180 °C), jolloin vaaleankeltaisen liuoksen väri muuttui vihreäksi. Reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja petroleetterin seos (1:1, v/v)). TLC-levyn perusteella reaktioseoksessa oli vain lähtöaineita. Reaktio toistettiin, jonka jälkeen liuoksen väri muuttui kellanruskeaksi. TLC:n perusteella amiini (**119**) kului reaktiossa, sillä sen antamaa täplää ei näkynyt reaktioseoksesta applikoidussa näytteessä.

Koska TLC-levyjen tulkinta ei ollut yksiselitteistä, reaktion edistymistä tarkasteltiin GC:n avulla. Tarkoituksena oli ensin saada selville, millä retentioajalla lähtöaineena käytetty amiini (**119**) kulkeutui kolonnin läpi. Tätä varten siitä valmistettiin liuos (0,15 M) etyyliasetaattiin. Ajoista (190 °C, 30 minuuttia) saadussa kromatogrammissa oli nähtävissä 2 piikkiä (RT noin 2 minuuttia ja RT noin 5 minuuttia). Tämän jälkeen amiinia (**119**) sisältävän näytteen joukkoon lisättiin tippa etikkahappoanhydridiä ja DMAP orgaanisessa liuotuksessa. Etikkahappoanhydridi reagoi amiinin (**119**) aminoryhmän kanssa DMAP:n aktivoimassa kyseistä reaktiota. Ajo uusittiin samoissa olosuhteissa kuin edellä ja pääteltiin, että nopeammin ilmaantuva piikki (RT noin 2 minuuttia) kuului amiinille (**119**). Sen retentioaika pyrittiin pidentämään, jotta piikki erottuisi selkeämmin alussa ilmaantuvista liuotinpiikeistä. Tämä tapahtui suorittamalla ajo alemmissa lämpötiloissa. Lämpötilaa laskettiin kerrallaan 20 °C (lämpötilat 170 °C, 150 °C ja 130 °C). Lämpötilassa 130 °C amiinin (**119**) retentioaika oli pidentynyt niin paljon, että sen antama piikki erottui selvästi liuotinpiikeistä.

Kun retentioajat eri lämpötiloissa oli saatu selville, tehtiin ajo mikroaaltoreaktorissa olleesta reaktioseoksesta otetulla näytteellä (190 °C ja 130 °C). Kromatogrammeista oli nähtävissä, että reaktioseoksessa oli lähtöaineena käytettyä amiinia (**119**), joten reaktio ei tapahtunut.

Ullmannin reaktiota kokeiltiin uudelleen mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 180 °C), ja reaktion edistymistä tarkasteltiin GC:n avulla TLC:n sijaan. Yhdiste (**107a**) (80 mg; 0,234 mmol) ja 2-metyylibentsyyliamiini (**119**) (28,4 mg; 0,234 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (2 ml) ja GC:iaa varten otettiin näyte (100 μ l). Reaktioseokseen lisättiin K_2CO_3 (81 mg; 0,59 mmol) ja CuI (4,5 mg; 23,4 μ mol). 20

minuutin kuluttua alussa vaaleankeltaisen liuoksen väri muuttui vihreäksi. GC:iaa varten otettiin näyte ja reaktio toistettiin, jonka jälkeen liuoksen väri muuttui kellanvihreäksi. Kolmannen reaktion jälkeen liuoksen väri muuttui keltaiseksi. Reaktion edistymistä tarkasteltiin GC:n avulla tekemällä ajot (130 °C) alkutilanteesta ja mikroaaltoreaktorissa olleista reaktioseoksista otetuista näytteistä. Kromatogrammista oli nähtävissä, että reaktioseoksissa oli lähtöaineena käytettyä amiinia (**119**), eli reaktio ei tapahtunut.

7.4.3. Palladiumreaktiot

Reaktioita tehtiin rinnakkain kaksi, jolloin oli mahdollista kokeilla kahta eri ligandia samanaikaisesti. Pd(OAc)₂ (1,64 mg; 7,3 μmol) ja ligandina toimiva dppe (5,82 mg; 14,6 μmol) tai dppf (8,09 mg; 14,6 μmol) liuotettiin kuivaan tolueeniin (5 ml). Seoksia refluksottiin 10 minuuttia. Alussa värittömät liuokset muuttuivat lämpötilan kohotessa väriltään ensin keltaiseksi ja lämpötilassa 110 °C ruskeiksi.

Yhdiste (**107a**) (50 mg; 0,146 mmol) ja 2-metyylilibentsyyliamiini (**119**) (17,7 mg; 0,146 mmol) liuotettiin kuivaan tolueeniin (5 ml), ja muodostunut samea seos lisättiin hitaasti refluksoitumassa olleiden seosten joukkoon. Lopuksi lisättiin NaOMe (8,68 mg; 0,161 mmol). Seosten annettiin refluksoitua useiden tuntien ajan, ja reaktioiden edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja petrolieetterin seos (1:1, v/v)). Reaktioseosten annettiin refluksoitua yön yli, ja seuraavana päivänä TLC:n avulla todettiin, etteivät reaktiot tapahtuneet.

Toisessa kokeilussa Pd(OAc)₂ (0,13 mg; 0,58 μmol), dppe (0,46 mg; 1,16 μmol), yhdiste (**107a**) (20 mg; 0,058 mmol) ja 2-metyylilibentsyyliamiini (**119**) (8,4 mg; 0,07 mmol) liuotettiin kuivaan DME:iin (3 ml). Lopuksi lisättiin NaOMe (4,4 mg; 0,08 mmol). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 150 °C, maksimipaine 7,2 baaria), jolloin alussa vaaleankeltaisen liuoksen väri muuttui keltaiseksi. Reaktion tapahtumista tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja petrolieetterin seos (1:1, v/v)). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, ettei reaktio tapahtunut, sillä reaktioseoksesta applikoidussa näytteessä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät. Reaktio toistettiin (maksimipaine 11,3 baaria), mutta se ei tapahtunut.

Kolmas kokeilu tapahtui karusellissa, jolloin reaktioita tehtiin rinnakkain kahdeksan (Taulukko 15). Niissä käytettiin palladiumia kahdessa eri muodossa (Pd(OAc)₂ tai Pd(dba)₂), kahta erilaista ligandia (dppe tai dppf) ja liuottimena oli joko kuiva tolueeni tai DME. Emäksenä jokaisessa reaktiossa toimi Cs₂CO₃.

Taulukko 15. Kahdeksan kokeiltua vaihtoehtoa palladiumreaktioissa.

| Vaihtoehto | Pd(II) | Ligandi | Liuotin | Emäs |
|------------|----------------------|---------|----------|---------------------------------|
| 1 | Pd(OAc) ₂ | dppe | DME | Cs ₂ CO ₃ |
| 2 | Pd(OAc) ₂ | dppe | Tolueeni | Cs ₂ CO ₃ |
| 3 | Pd(OAc) ₂ | dppf | DME | Cs ₂ CO ₃ |
| 4 | Pd(OAc) ₂ | dppf | Tolueeni | Cs ₂ CO ₃ |
| 5 | Pd(dba) ₂ | dppe | DME | Cs ₂ CO ₃ |
| 6 | Pd(dba) ₂ | dppe | Tolueeni | Cs ₂ CO ₃ |
| 7 | Pd(dba) ₂ | dppf | DME | Cs ₂ CO ₃ |
| 8 | Pd(dba) ₂ | dppf | Tolueeni | Cs ₂ CO ₃ |

Yhdiste (**107a**) (10 mg; 0,03 mmol) ja 2-metyylilibentsyyliamiini (**119**) (4,24 mg; 0,035 mmol) liuotettiin käytettävään liuottimeen (1 ml). Neljässä tapauksessa liuottimena oli kuiva tolueeni ja neljässä tapauksessa kuiva DME. Kyseiset lähtöaineet lisättiin argonsuojakaasun alla olevan Pd(OAc)₂:ia (0,34 mg; 1,5 μmol) tai Pd(dba)₂:ia (0,17 mg; 0,3 μmol), Cs₂CO₃:ia (14,3 mg; 0,044 mmol) ja ligandia sisältävän seoksen joukkoon. Ligandina toimi dppe (1,2 mg; 3 μmol tai 0,24 mg; 0,6 μmol) tai dppf (1,7 mg; 3 μmol tai 0,33 mg; 0,6 μmol). Reaktioita sekoitettiin lämpötilassa 120 °C neljän vuorokauden ajan ja edistymistä seurattiin TLC:n (ajoliuoksena etyyliasetatin ja petrolietterin seos (1:1, v/v)) ja GC:n avulla. TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa, jolloin joissakin levyissä havaittiin heikko täplä (R_F-arvo noin 0,90).

GC:n (ajoaika 61 minuuttia, lämpötilaväli 150-250 °C, nosto 20 °C/min) avulla seurattiin, miten lähtöaineena käytetyn amiinin (**119**) antaman piikin pinta-ala muuttui reaktioseoksesta otetuissa näytteissä ajan kuluessa. Reaktioseoksista otettiin näytteet (100 μl), joihin lisättiin tippa etikkahappoanhydridiä. GC:n kromatogrammien perusteella todettiin, ettei amiinin (**119**) antaman piikin pinta-ala merkittävästi pienentynyt missään

reaktiossa ajan kuluessa, vaan sitä oli jäljellä kaikissa näytteissä. Reaktiot eivät siis tapahtuneet.

7.4.4. Reaktio fosfaattiaihio-osan ja primaarisen amiinin välillä

2-Metyyli-bentsyyliamiini (**119**) (184 mg; 1,52 mmol) ja Cs_2CO_3 (593 mg; 1,82 mmol) liuotettiin DMF:iin (25 ml), ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 30 minuuttia. Fosfaattiaihio-osa (**106a**) (496 mg; 1,52 mmol) liuotettiin DMF:iin (15 ml), seos lisättiin hitaasti edellisen liuoksen joukkoon ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion tapahtumista tarkasteltiin TLC:n (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja petrolieetterin seos (1:1, v/v)) avulla. TLC-levyllä näkyi useita heikkoja täpliä, mutta niistä ei varmuudella voitu sanoa, kuuluivatko ne lähtöaineille vai mahdolliselle tuotteelle. Siksi reaktion etenemistä tarkasteltiin myös GC:n (ajoaika 30 minuuttia, lämpötila 130 °C) avulla. Sitä varten reaktioseoksesta otettiin näyte (100 μl), johon lisättiin tippa etikkahappoanhydridiä. Kromatogrammien perusteella reaktioseoksesta otetussa näytteessä oli amiinia (**119**) jäljellä vain vähän, eli se kului reaktiossa.

Seos suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja vaaleankeltainen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 25x3,5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuoksina olivat etyyliasetaatin ja petrolieetterin seokset (1:2, 1:1 ja 2:1 v/v), DCM ja 2-propanoli. Mahdollista tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi valkoinen kiinteä haihdutusjäännös.

Toisessa kokeilussa reaktioita tehtiin rinnakkain kolme siten, että yhdessä reaktiossa ei käytetty lainkaan emästä ja kahdessa muussa emäksinä toimivat K_2CO_3 (5,1 mg; 0,037 mmol) tai PEMP (5,8 mg; 0,037 mmol). 2-Metyyli-bentsyyliamiini (**119**) (3,8 mg; 0,031 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (1 ml), johon lisättiin edellä mainittu emäs. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 15 minuuttia. Fosfaattiaihio-osa (**106a**) (10 mg; 0,031 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (1 ml), ja liuos lisättiin hitaasti edellisten seosten joukkoon. Sekoittamista jatkettiin huoneenlämpötilassa kolmen vuorokauden ajan ja reaktioseoksia refluksoitiin tämän jälkeen yön yli. Reaktioiden edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksina etyyliasetaatin ja petrolieetterin seokset (1:1, 1:2 ja 1:9 v/v)), mutta reaktiot eivät tapahtuneet.

Kolmannessa kokeilussa reaktioita tehtiin rinnakkain viisi. Edellä mainittujen emästen lisäksi kokeiltiin myös NaH:iä (3,1 mg; 0,13 mmol) ja Ag_2O :ia (18,1 mg; 0,078 mmol). Liuottimena oli edellisestä poiketen kuiva THF (1 ml). Lisäksi fosfaattiaihio-osan (**106a**)

kloori korvattiin ensin jodilla käsittelemällä sitä NaI:lla (5,6 mg; 0,037 mmol) asetonissa (1 ml). Reaktioseoksia sekoitettiin huoneenlämpötilassa kolmen vuorokauden ajan ja tämän jälkeen refluksoitiin noin 48 tunnin ajan. Ag₂O:ia sisältävää seosta ei refluksoitu, vaan sitä sekoitettiin koko ajan huoneenlämpötilassa. NaH:ia sisältävään seokseen lisättiin NaH:ia toiset 3 ekvivalenttia (3,1 mg; 0,13 mmol), jonka jälkeen seosta refluksoitiin vielä yhden yön yli. TLC-levyjen perusteella yön yli refluksoinnin jälkeen NaH:ia sisältävästä reaktioseoksesta applikoidussa näytteessä oli nähtävissä täplä (R_f-arvo noin 0,56). Ag₂O:ia sisältävästä reaktioseoksesta applikoidussa näytteessä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät, joten kyseinen reaktio ei tapahtunut. Muista reaktioseoksista TLC-levyille applikoiduissa näytteissä ei ollut nähtävissä lähtöaineena käytetyn amiinin (**119**) täplää, joten se kului reaktioissa.

Reaktioiden edistymistä tarkasteltiin myös GC:n avulla (ajokaika 61 minuuttia, lämpötilaväli 150-250 °C, nosto 20 °C/min). Tarkoituksena oli ensin saada selville, millä retentioajalla lähtöaineena käytetty dibentsyylijodimetyylifosfaatti (**106a**) kulkeutui kolonnin läpi. Tätä varten siitä valmistettiin liuos (0,02 M) THF:iin. Kromatogrammissa oli nähtävissä piikki (RT noin 1,9 minuuttia).

Tämän jälkeen reaktioseoksista otettiin näyte (100 µl) ja joukkoon lisättiin tippa etikkahappoanhydridiä. Spektrien perusteella todettiin, että Ag₂O:ia sisältävän reaktioseoksen tapauksessa amiinin (**119**) antaman piikin pinta-ala ei pienentynyt ajan kuluessa ja muista reaktioseoksista todettiin, että lähtöaineita oli niissä merkittävästi jäljellä. NaH:ia sisältävän reaktioseoksen tapauksessa sekä amiinin (**119**) että fosfaattiaihiio-osan (**106a**) antamien piikkien pinta-alat pienenevät ajan kuluessa eli ne kuluivat reaktiossa.

Tätä reaktiota kokeiltiin uudelleen suuremmalla ainemäärällä. 2-Metyylidibentsyyliamiini (**119**) (93 mg; 0,77 mmol) ja NaH (185 mg; 7,7 mmol) liuotettiin kuivaan THF:iin (30 ml) ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1,5 tuntia. Fosfaattiaihiio-osa (**106a**) (301 mg; 0,92 mmol) ja NaI (165 mg; 1,1 mmol) liuotettiin asetoniin (30 ml) ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1,5 tuntia, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostuneesta dibentsyylijodimetyylifosfaatista otettiin näyte TLC:iaa varten. Loppuosa liuotettiin kuivaan THF:iin (30 ml), ja liuos lisättiin hitaasti amiinia (**119**) ja NaH:ia sisältävän seoksen joukkoon. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa ja refluksoitiin noin 48 tunnin ajan. Kun seosta oli refluksoitu noin 24 tuntia, joukkoon

lisättiin vielä 2 ekvivalenttia NaH:iä (61 mg; 2,56 mmol). Reaktion tapahtumista tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuksena etyyliasettiin ja petrolietterin seos (1:9, v/v)). NaH poistettiin reaktioseoksesta otetuista näytteistä tiputtamalla joukkoon tippa EtOH:ia, jotta se ei häiritsisi TLC-levyjen tulkintaa. Refluksoitumassa olleesta reaktioseoksesta applikoiduissa näytteissä oli TLC-levyillä nähtävissä täplä (R_f -arvo noin 0,46).

GC:n (ajoaika 61 minuuttia, lämpötilaväli 150-250 °C, nosto 20 °C/min) avulla seurattiin, miten lähtöaineina käytettyjen amiinin (**119**) ja fosfaattiaihio-osan (**106a**) antamien piikkien pinta-alat muuttuivat reaktioseoksesta otetuissa näytteissä ajan kuluessa. Kromatogrammeista oli nähtävissä, että molempien lähtöaineiden antamien piikkien pinta-alat pienenivät ajan kuluessa eli ne kuluivat reaktiossa.

NaH poistettiin reaktioseoksesta lisäämällä EtOH (1,5 ekv.). Seos suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja oranssinruskea kiinteä haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 7x3,5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuksina olivat DCM ja etyyliasettiini. TLC-levyjen ajoliuksena oli 1 % MeOH DCM:ssa. Mahdollista tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi fraktioista riippuen keltainen nestemäinen, väritön nestemäinen tai punertava nestemäinen haihdutusjäännös. Reaktio ei kuitenkaan tapahtunut.

Viimeisessä kokeilussa fosfaattiaihio-osa (**106a**) (167 mg; 0,51 mmol) ja 2-metyyli-bentsyyliamiini (**119**) (52 mg; 0,43 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (7,5 ml). Ne lisättiin koeputkeen, jossa oli Cs_2CO_3 (166 mg; 0,51 mmol) argonsuojakaasun alla. Sameaa seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa kolmen vuorokauden ajan. Reaktion tapahtumista seurattiin TLC:n avulla (ajoliuksena etyyliasettiin ja petrolietterin seos (1:9, v/v)). TLC-levyillä oli nähtävissä mahdollisesta tuotteesta kertova täplä (R_f -arvo noin 0,57). GC:n (ajoaika 61 minuuttia, lämpötilaväli 150-250 °C, nosto 20 °C/min) avulla todettiin, että lähtöaineena käytetty amiini (**119**) kului reaktiossa.

Seos suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja vaaleanruskea haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 7x3,5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuksena oli etyyliasettiin ja petrolietterin seos (9:1, v/v). TLC-levyjen ajoliuksena oli etyyliasettiini. Mahdollista tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi valkoinen kiinteä haihdutusjäännös. Reaktio ei kuitenkaan tapahtunut.

7.5. SYNTEESISTRATEGIA III

7.5.1. Reaktio sulfametatsiinin ja dibentsyylijodimetyylifosfaatin välillä

Sulfametatsiini (**111**) (730 mg; 2,43 mmol) liuotettiin DMF:iin (100 ml) ja joukkoon lisättiin Cs_2CO_3 (951 mg; 2,92 mmol) koko ajan sekoittaen. Kaikki Cs_2CO_3 ei liennut orgaaniseen liuottimeen. Sameaa seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1,5 tuntia.

Fosfaattiaihio-osa (**106a**) (955 mg; 2,92 mmol) ja NaI (525 mg; 3,50 mmol) liuotettiin asetoniin (50 ml), ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1,5 tuntia, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostuneesta dibentsyylijodimetyylifosfaatista otettiin näyte TLC:iaa varten. Loppuosa liuotettiin DMF:iin (50 ml) ja lisättiin hitaasti sulfametatsiinia (**111**) ja Cs_2CO_3 :ia sisältävän seoksen joukkoon. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksena oli 5 % MeOH DCM:ssa). Levyä tarkasteltiin UV-valossa ja havaittiin täplä (R_f -arvo noin 0,84).

Seos suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja ruskea nestemäinen raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 30x4 cm). Ajoliuoksina pylväskromatografiassa olivat DCM sekä MeOH (5–10 %) DCM:ssa. Yksi fraktio, josta näkyi TLC-levyllä täplä, haihdutettiin kuiviin. Jäljelle jäi keltainen nestemäinen jäännös. Reaktio ei kuitenkaan tapahtunut.

Toinen kokeilu tehtiin samalla tavalla, mutta pienemmällä ainemäärällä. Sulfametatsiini (**111**) (50 mg; 0,166 mmol) liuotettiin DMSO:iin (10 ml) ja Cs_2CO_3 :n sijasta käytettiin Ag_2O :ia (115 mg; 0,496 mmol). Reaktiota seurattiin TLC:n avulla ja todettiin, ettei se tapahtunut.

7.5.2. Reaktio sulfametatsiinin ja dibutyyljodimetyylifosfaatin välillä

Sulfametatsiini (**111**) (387 mg; 1,29 mmol) liuotettiin DMF:iin (50 ml) ja joukkoon lisättiin Cs_2CO_3 (504 mg; 1,55 mmol) koko ajan sekoittaen. Sameaa seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 2,5 tuntia.

Fosfaattiaihio-osa (**106b**) (400 mg; 1,55 mmol) ja NaI (279 mg; 1,86 mmol) liuotettiin asetoniin (25 ml), ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 1,5 tuntia, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostuneesta dibutyyljodimetyylifosfaatista otettiin näyte TLC:iaa varten. Loppuosa liuotettiin DMF:iin (25 ml), ja liuos lisättiin hitaasti sulfametatsiinia (**111**) ja Cs_2CO_3 :ia sisältävän seoksen joukkoon. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n

avulla (ajoliuoksena 2 % MeOH DCM:ssa). Levyä tarkasteltiin UV-valossa, jolloin havaittiin täplä (R_f -arvo noin 0,71).

Seos suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja vaaleanruskea kiinteä raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 25x3 cm). Ajoliuoksina pylväskromatografiassa olivat DCM sekä MeOH (2-15 %) DCM:ssa. Fraktiot, joista näkyi TLC-levyillä täplä, haihdutettiin kuiviin. Jäljelle jäi fraktiosta riippuen joko keltainen nestemäinen jäännös tai keltainen kiinteä jäännös. Reaktio ei kuitenkaan tapahtunut.

Toinen kokeilu tehtiin samalla tavalla, mutta pienemmällä ainemäärällä. Sulfametatsiini (**111**) (50 mg; 0,166 mmol) liuotettiin DMSO:iin (10 ml), ja joukkoon lisättiin Ag₂O (115 mg; 0,496 mmol). Reaktiota seurattiin TLC:n avulla ja todettiin, ettei se tapahtunut.

7.6. SYNTEESISTRATEGIA IV

Reaktiota kokeiltiin kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä kokeilussa DPMB A (**1**) (111 mg; 0,274 mmol) liuotettiin THF:iin (10 ml), ja joukkoon lisättiin paraformaldehydi (9,88 mg; 0,329 mmol), K₂CO₃ (38 mg; 0,274 mmol) ja vesi (0,1 ml). Väritöntä seosta refluksoitiin yön yli. Reaktion edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksina 4,5 % MeOH DCM:ssa sekä etyyliasetaatin ja heksaanin seos (1:2, v/v)). TLC-levyjä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, ettei reaktio tapahtunut.

Toinen kokeilu tehtiin samoilla ainemäärillä mikroaaltoreaktorissa (10 minuuttia, lämpötila 180 °C, maksimipaine 5,2 baaria). Reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin seos (1:2, v/v)). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, ettei reaktio tapahtunut.

7.7. REAKTIOT FOSFAATTIAIHIO-OSAN JA AMIINIEN VÄLILLÄ

7.7.1. N-(2-metylibentsyyli)aniliini

Aniliini (**120**) (500 mg; 5,37 mmol), 2-metylibentsyylibromidi (**110**) (994 mg; 5,37 mmol) ja TEA (136 mg; 1,34 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:iin (3 ml). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 180 °C, maksimipaine 9,7 ja 10,5 baaria), jolloin alussa vaaleanoranssin liuoksen väri muuttui kellanvihreäksi. Reaktion tapahtuminen varmistettiin TLC:n avulla (ajoliuoksena 0,5 % etyyliasetaatin petrolieetterissä). TLC-levyllä oli nähtävissä tuotteesta kertova täplä (R_f -arvo noin 0,30).

Liuotin haihdutettiin ja vihreä kiinteä haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 17x5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuoksena oli DCM ja TLC-levyjen ajoliuoksena oli 1 % MeOH DCM:ssa. Tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi vihreä nestemäinen haihdutusjäännös. *N*-(2-metyylibentsyyli)aniliinin (**121**) saanto oli 874 mg (4,43 mmol; 82 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,44 (d; *J* = 7,2 Hz; 1H, arom.); 7,29 (m, 5H, arom.); 6,84 (t; *J* = 7,2 ja 7,6 Hz; 1H, arom.); 6,74 (d; *J* = 8,0 Hz; 2H, arom.); 4,36 (s, 2H, CH₂); 4,00 (s, 1H, NH); 2,45 (s, 3H, CH₃);

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 148,29; 137,05; 136,44; 130,52; 129,39 (2C); 128,38; 127,54; 126,27; 117,66; 112,90 (2C); 46,53 (CH₂); 19,04 (CH₃)

7.7.2. Reaktio fosfaattiaihiio-osan ja sekundaarisen amiinin välillä

N-(2-metyylibentsyyli)aniliini (**121**) (10 mg; 0,051 mmol) liuotettiin käytettävään liuottimeen (3 ml). Kolmessa tapauksessa liuottimena oli kuiva DMF ja yhdessä tapauksessa kuiva DMSO. Kolmeen DMF:ia sisältävään reaktioastiaan lisättiin emäs. Emäksinä toimivat NaH (6,1 mg; 0,25 mmol), Cs₂CO₃ (19,9 mg; 0,061 mmol) tai PEMP (9,5 mg; 0,061 mmol). DMSO:ia sisältävään reaktioastiaan lisättiin Ag₂O (35,5 mg; 0,153 mmol). Reaktioastiat suojattiin kosteuden vaikutukselta CaCl₂-putkella.

Fosfaattiaihiio-osa (**106a**) (19,9 mg; 0,061 mmol) ja NaI (10,9 mg; 0,073 mmol) liuotettiin asetoniin (5 ml) ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa tunnin ajan, jolloin kloori korvautui jodilla. Muodostuneesta dibentsyylijodimetyylifosfaatista otettiin näyte TLC:iaa varten. Loppuosa liuotettiin käytettävään liuottimeen, joka oli joko kuiva DMF (2 ml) tai kuiva DMSO (2 ml), ja liuos lisättiin hitaasti sekundaarista amiinia (**121**) ja emästä sisältävän seoksen joukkoon. Reaktioseoksia sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin 24 tuntia ja refluksoitettiin noin 48 tuntia. Ag₂O:ia sisältävää reaktioseosta sekoitettiin samaan aikaan huoneenlämpötilassa. Reaktioiden edistymistä seurattiin TLC:n avulla (ajoliuoksina DCM sekä etyyliasettiin ja petrolieetterin seokset (1:9 ja 1:12, v/v)). Levyt analysoitiin UV-valossa ja todettiin, ettei mikään reaktioista tapahtunut.

7.7.3. Reaktio fosfaattiaihiio-osan ja primaarisen amiinin välillä

2-Metyylibentsyyliamiini (**119**) (6,18 mg; 0,051 mmol), fosfaattiaihiio-osa (**106a**) (20 mg; 0,061 mmol) ja TEA (1,32 mg; 0,013 mmol) liuotettiin DMF:iin (1 ml). Reaktio tehtiin

mikroaaltoreaktorissa (20 minuuttia, lämpötila 180 °C, maksimipaine 4,0 baaria), jolloin alussa värittömän liuoksen väri muuttui keltaiseksi. Reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasettiin ja petrolieetterin seos (1:2, v/v)). TLC-levyä tarkasteltiin UV-valossa ja todettiin, ettei reaktio tapahtunut, sillä reaktioseoksesta applikoidussa näytteessä oli nähtävissä vain lähtöainetäplät.

Toinen kokeilu tehtiin muuten samalla tavalla, mutta toisena lähtöaineena oli bentsyyliamiini (**122**) (5,46 mg; 0,051 mmol). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (maksimipaine 2,9 baaria), jolloin alussa värittömän liuoksen väri muuttui vaaleankeltaiseksi. Reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasettiin ja petrolieetterin seos (1:6, v/v)). Mahdollisesta tuotteesta kertova täplä (R_f -arvo noin 0,73) oli nähtävissä. Raakatuotteelle ei tässä työssä tehty pylväspuhdistusta.

Kolmannessa kokeilussa toisena lähtöaineena oli aniliini (**120**) (119 mg; 1,28 mmol). Reaktio tehtiin mikroaaltoreaktorissa (maksimipaine 3,3 baaria). Reaktion edistymistä tarkasteltiin TLC:n avulla (ajoliuoksena etyyliasettiin ja petrolieetterin seos (1:2, v/v)). Mahdollisesta tuotteesta kertova täplä (R_f -arvo noin 0,90) oli nähtävissä. Liuotin haihdutettiin ja kellanoranssi nestemäinen haihdutusjäännös puhdistettiin pylväskromatografisesti (valmistetun silikageelipylvään mitat noin 20x3,5 cm). Pylväskromatografiassa ajoliuoksena oli DCM. TLC-levyjen ajoliuoksena oli 1 % MeOH DCM:ssa. Mahdollista tuotetta sisältävät fraktiot haihdutettiin kuiviin, jolloin jäljelle jäi vaaleankeltainen nestemäinen haihdutusjäännös. Reaktio ei kuitenkaan tapahtunut.

8. TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Potentiaalisten lääkeainekandidaattien huono vesiliukoisuus on yksi suurimmista syistä siihen, ettei niistä ei saada kehitettyä valmiita lääkkeitä. Lääkeainekandidaattien vesiliukoisuus riippuu niiden kemiallisesta rakenteesta sekä molekyylin muodosta ja koosta. Vesiliukoisuuteen vaikuttavat myös käytettävien liuottimien ominaisuudet, pH-olosuhteet ja lämpötila. Erityisesti lääkeaineen imeytyminen ja biologinen hyötyosuus ovat riippuvaisia sen vesiliukoisuudesta. Vesiliukoisuus vaikuttaa imeytymisen lisäksi lääkeaineen jakautumiseen ja metaboliaan elimistössä sekä erittymiseen elimistöä.

Liukoisuutta ja siihen liittyviä käsitteitä, kuten imeytyminen ja permeabiliteetti, voidaan määrittää esimerkiksi MAD-arvon avulla. Kokeellisesti liukoisuus voidaan määrittää joko termodynaamisesti tai kineettisesti. Biofarmaseuttinen luokittelujärjestelmä

luokittelee lääkeaineet neljään luokkaan niiden vesiliukoisuuden ja permeabiliteetin perusteella. Näin voidaan ennustaa lääkeaineen imeytymistä ruoansulatuskanavasta.

Vesiliukoisuuden lisäämiseksi on kehitetty useita menetelmiä. Vesiliukoisuutta voidaan parantaa kemiallisin ja fysikaalisin menetelmin sekä muilla menetelmillä. Kemiallisia menetelmiä ovat esimerkiksi pH:n muuttaminen ja suolanmuodostus sekä aihiolääkkeen valmistaminen. Siinä lääkeaineen kemiallista rakennetta muokataan liittämällä lääkeainemolekyyliin vesiliukoisuutta lisäävä rakenne joko suoraan tai linkkerin välityksellä. Vesiliukoisuutta lisäävänä rakenteena voi toimia neutraali ryhmä, kuten PEG, ionisoituva orgaaninen happo tai emäs, sokeriosa tai fosfaatti. Eräs käytetyimmistä menetelmistä aihiolääkkeen valmistamiseksi on käyttää aihio-osana fosforihapon amideja tai estereitä.

Fysikaalisia menetelmiä ovat esimerkiksi kiinteiden dispersioiden valmistaminen ja partikkelikoon muuttaminen nanopartikkeleita tai nanosuspensioita valmistamalla sekä kiderakenteen muokkaaminen. Muihin menetelmiin kuuluu esimerkiksi inkluusiokompleksien muodostaminen käyttämällä apuna syklodekstriinejä.

Tutkielman kokeellisen osan tarkoituksena oli parantaa huonosti veteen liukenevan DPMBA:n (**1**) vesiliukoisuutta. Tehdyissä liukoisuuskokeissa DPMBA ei liennut veteen suolana eikä fysiologiseen suolaliuokseen, vaikka tällöin joukkoon lisättiin vesiliukoisuutta lisäävä polysorbaatti (Tween 80). Vesiliukoisuuden parantamiseksi DPMBA:sta pyrittiin valmistamaan fosfaattiaihiolääke liittämällä siihen vesiliukoisuutta lisäävä fosfaattiesterirakenne.

Kokeellinen osa käsitti neljä eri synteesistrategiaa (I-IV, Kaavio 27). Strategiassa I DPMBA (**1**) sekä kaksi erilaista fosfaattiaihio-osaa, dibentsyylikloorimetyylifosfaatti (**106a**) ja dibutylikloorimetyylifosfaatti (**106b**), syntetisoitiin onnistuneesti. Fosfaattiaihio-osien liittämistä suoraan DPMBA:han kokeiltiin käyttämällä eri emäksiä, liuottimia ja reaktio-olosuhteita. Reaktiot eivät kuitenkaan tapahtuneet. Strategiassa II syntetisoitiin onnistuneesti 4-bromi-*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)benseenisulfonamidi (**107a**) ja 4-kloori-*N*-(4,6-dimetyylipyrimidin-2-yyli)benseenisulfonamidi (**107b**). Siinä kokeiltiin 2-metyylibentsyyliamiinin (**119**) liittämistä näiden molekyylien aromaattiseen renkaaseen kuparin (Ullmannin reaktio) ja palladiumin (Buchwald-Hartwigin kytkentäreaktio) avulla, mutta reaktiot eivät tapahtuneet. Lisäksi kokeiltiin reaktiota yhdisteiden (**106a**) ja (**119**) välillä käyttämällä eri emäksiä, liuottimia ja

reaktio-olosuhteita. Mikäli tämä olisi onnistunut, olisi syntyneen sekundaarisen amiinin liittämistä yhdisteiden (**107a-b**) aromaattiseen renkaaseen kokeiltu Ullmannin reaktion tai Buchwald-Hartwigin kytkentäreaktion avulla, jolloin olisi muodostunut tavoiteltu suojattu fosfaattiaihiolääke.

Strategiassa III kokeiltiin fosfaattiaihio-osien (**106a-b**) liittämistä DPMBAn synteesissä lähtöaineena käytetyn sulfametatsiinin (**111**) primaariseen aminoryhmään. Mikäli tämä olisi onnistunut, olisi syntyneen rakenteen sekundaariseen aminoryhmään pyritty liittämään 2-metyylibentsyylibromidi (**110**), jolloin olisi muodostunut tavoiteltu suojattu fosfaattiaihiolääke. Reaktiota fosfaattiaihio-osien ja sulfametatsiinin välillä kokeiltiin käyttämällä eri emäksiä, liuottimia ja reaktio-olosuhteita, mutta reaktio ei tapahtunut. Strategiassa IV tarkasteltiin hydroksimetyyliryhmän liittämistä DPMBAn aniliiniseen typpiin. Reaktio ei tapahtunut.

Työssä kokeiltiin myös rakenteeltaan yksinkertaisten primaaristen ja sekundaaristen amiinien liittämistä fosfaattiaihio-osaan. Tätä varten syntetisoitiin onnistuneesti sekundaarinen amiini, *N*-(2-metyylibentsyyli)aniliini (**121**). Primaarisina amiineina kokeiltiin aniliinia (**120**) ja 2-metyylibentsyyliamiinia (**119**). Tässä käytettiin samaa menetelmää kuin DPMBAn synteesissä.

Fosfaattiaihio-osia (**106a-b**) ei useista kokeiluista huolimatta saatu liittymään DPMBahan (**1**) tai sulfametatsiiniin (**111**). Reaktio dibentsyylikloorimetyylifosfaatin (**106a**) ja yksinkertaisten primaaristen ja sekundaaristen amiinien välillä ei myöskään tapahtunut. Osassa näistä kokeiluista reaktio fosfaattiaihio-osan ja amiinin välillä tapahtui, mutta fosfaattiaihio-osa hajosi reaktioissa. Fosfaattiaihiolääkkeen synteesin kannalta nämä havainnot osoittautuivat harmillisiksi.

DPMBAn (**1**) kemiallinen rakenne osoittautui työn tavoitteen kannalta haastavaksi. DPMBAssa on sulfonyyliryhmä, joka elektroneja puoleensavetävänä ryhmänä heikentää rakenteessa olevien sekundaaristen typpiatomien nukleofiilisyyttä. Lisäksi steerisillä tekijöillä saattaa olla oma vaikutuksensa. Kirjallisuudessa on esitetty esimerkkejä, joissa vesiliukoisuutta lisäävä fosfaattiesterirakenne on liitetty onnistuneesti lääkeainemolekyylin^{20,62,199,219–221}. Näissä esimerkeissä fosfaattiaihio-osa on liittynyt tyypillisesti joko suoraan tai linkkerin välityksellä lääkeaineen sekundaariseen hydroksyyliin, sekundaariseen aminoryhmään tai hydantoinirakenteen tyyppiin.

DPMBA:n tapauksessa fosfaattiaihiio-osa oli tarkoitus liittää sen aniliiniseen typpiin soveltamalla kirjallisuudessa esitettyjä menetelmiä.

Aihiolääkkeen valmistamista toimivampi menetelmä saattaa olla esimerkiksi inkluusiokompleksin tekeminen käyttämällä apuna syklodekstriinejä tai kiinteän dispersion valmistaminen. Näiden lisäksi kyseeseen voisi tulla myös partikkelikoon muuttaminen. DPMBA:n tiedetään liukenevan DMSO:iin, jota voisi käyttää tarvittaessa liuottimena näissä menetelmissä.

Patentissa, jossa kuvataan DPMBA:n rakenne ja synteesi, on esitetty myös useita muita kemialliselta rakenteeltaan samankaltaisia molekyyliä, ja siinä mainitaan DPMBA:n lisäksi myös muita selektiivisesti tiettyihin α_2 -adrenoseptoreihin sitoutuvia rakenteita¹². Mahdollisesti jokin näistä voisi sopia DPMBA:ta paremmin fosfaattiaihiolääkkeen valmistamiseen.

VIIITTEET

- ¹Kumar, A., Sahoo, S. K., Padhee, K., Kochar, P. P. S., Satapathy, A. ja Pathak, N. *Int. J. Compr. Pharm.* **2011**, 2, 1–7.
- ²Oprea, T. I. *Mol. Diversity* **2000**, 5, 199–208.
- ³Bergström, C. A. S. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 96, 156–161.
- ⁴Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, 44, 235–249.
- ⁵Patravale, V. B., Date, A. A. ja Kulkarni R. M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, 56, 827–840.
- ⁶Savjani, K. T., Gajjar, A. K. ja Savjani, J. K. *ISRN Pharm.* **2012**, 1–10.
- ⁷Patel, J. N., Rathod, D. M., Patel, N. A. ja Modasiya, M. K. *Int. J. of Pharm. & Life Sci.* **2012**, 3, 1459–1469.
- ⁸Mukesh, D. *Int. Pharm.Sci.* **2012**, 2, 28–35.
- ⁹Fahr, A. ja Liu, X. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2007**, 4, 403–416.
- ¹⁰Kumpulainen, H. Novel Prodrug Structures for Improved Drug Delivery. Kopijyvä, Kuopio **2007**.
- ¹¹Heimbach, T., Fleisher, D. ja Kaddoumi, A. Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery. Teoksessa Stella, V. J., Borchardt, R. T., Hageman, M. J., Oliyai, R., Maag, H. ja Tilley, J. W. (toim.) Prodrugs: Challenges and Rewards, Part I. Springer, Yhdysvallat **2007**.
- ¹²Joutsamo, T., Tauber, A. Y., Salo, H., Hoffrén, A.-M. ja Wurster, S. *WO03008387* **2003**, 1-42.
- ¹³Calzada, B. C. ja de Artiñano, A. A. *Pharm. Res.* **2001**, 44, 195–208.
- ¹⁴International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology – Gold Book. Versio 2.3.2. **2012**.
- ¹⁵Juntunen, J. Water-Soluble Prodrugs of Cannabinoids. Kopijyvä, Kuopio **2005**.
- ¹⁶Alsenz, J. ja Kansy, M. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2007**, 59, 546–567.
- ¹⁷Fligge, T. A. ja Schuler, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 42, 449–454.
- ¹⁸U. S. Pharmacopeia. 36. painos. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville **2012**.

- ¹⁹U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry - Waivers of In Vivo Demonstration of Bioequivalence of Animal Drugs in Soluble Powder Oral Dosage Form Products and Type A Medicated Articles, Rockville **2008**.
- ²⁰Stella, V. J. ja Nti-Addae, K. W. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 677–694.
- ²¹Hildebrand, J. H. ja Scott, R. L. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1950**, *1*, 75–92.
- ²²Delaney, J. S. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 289–295.
- ²³Lüder, K. Solubility of Drug Molecules Predicted by Computer Simulations and Approximate Theory. Göteborg University, Göteborg **2007**.
- ²⁴Bakhle, S. S., Upadhye, K. P., Dixit, G. R. ja Wadetwar, R. N. *Int. J. Pharm. Technol.* **2010**, *2*, 1230–1240.
- ²⁵Stegemann, S., Leveiller, F., Franchi, D., de Jong, H. ja Lindén, H. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *31*, 249–261.
- ²⁶Martinez, M. N. ja Amidon, G. L. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 620–643.
- ²⁷Yu, L. X. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1883–1887.
- ²⁸Dali, M. V. ja Carstensen, J. T. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 155–162.
- ²⁹Mosharraf, M. ja Nyström, C. *Int. J. Pharm.* **1995**, *122*, 35–47.
- ³⁰Ni, N., Sanghvi T. ja Yalkowsky, S. H. *Int. J. Pharm.* **2002**, *244*, 99–104.
- ³¹Heikkilä, T. Miniaturization of Drug Solubility and Dissolution Testings. Helsinki University Print, Helsinki **2010**.
- ³²Rolan, P. ja Molnár, V. Clinical pharmacokinetics. Teoksessa Griffin, J. P. ja O’Grady, J. (toim.) *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*. 5. painos. Blackwell Publishing Ltd., Oxford **2006**.
- ³³Revathi, S. ja Dhana Raju, M. D. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *2*, 89–107.
- ³⁴Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P. ja Crison, J. R. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 413–420.
- ³⁵Kumar, K. M. ja Anil, B. *Int. Res. J. Pharm.* **2012**, *3*, 5–10.
- ³⁶Bard, B., Martel, S. ja Carrupt, P.-A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 230–240.

- ³⁷Dehring, K. A., Workman, H. L., Miller, K. D., Mandagere, A. ja Poole, S. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 447–456.
- ³⁸Saal, C. ja Petereit, A. C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 589–595.
- ³⁹Avdeef, A., Berger, C. M. ja Brownell, C. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 85–89.
- ⁴⁰Fioritto, A. F., Bhattachar, S. N. ja Wesley, J. A. *Int. J. Pharm.* **2007**, *330*, 105–113.
- ⁴¹Kerns, E. H. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1838–1858.
- ⁴²Hoelke, B., Gieringer, S., Arlt, M. ja Saal, C. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3165–3172.
- ⁴³Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. ja Feeney, P. J. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- ⁴⁴Kibbey, C. E., Poole, S. K., Robinson, B., Jackson, J. D. ja Durham, D. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1164–1175.
- ⁴⁵Segall, M. D., Beresford, A. P., Gola, J. M. R., Hawksley, D. ja Tarbit, M. H. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2*, 325–337.
- ⁴⁶Rezvanfar, M. A., Rahimi, H. R. ja Abdollahi, M. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 1231–1245.
- ⁴⁷Belpaire, F. M. ja Bogaert, M. G. The Fate of Xenobiotics in Living Organisms. Teoksessa Wermuth, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. 2. painos. Elsevier Academic Press, Englanti **2003**.
- ⁴⁸Kalliokoski, A. ja Niemi, M. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 693–705.
- ⁴⁹Jatwani, S., Rana, A. C., Singh, G. ja Aggarwal, G. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 942–956.
- ⁵⁰Ajaykumar, B., Sridivya, G., Narendrababu, N. V., Lavanya, R., Ujvala, K., Chandra, S. B. ja Rakesh, C. B. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2012**, *2*, 364–371.
- ⁵¹Taylor, M. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *19*, 131–148.
- ⁵²Sugawara, M., Kadomura, S., He, X., Takekuma, Y., Kohri, N. ja Miyazaki, K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *26*, 1–8.
- ⁵³Bhati, R. ja Nagrajan, R. K. *Int. J. Pharm. Sci.* **2012**, *3*, 659–681.

- ⁵⁴Johnson, K. C. ja Swindell, A. C. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1795–1798.
- ⁵⁵Curatolo, W. *Pharm. Sci. Tech. Today* **1998**, *1*, 387–393.
- ⁵⁶Peck, T., Hill, S. ja Williams, M. *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*. 3. painos. Cambridge University Press, Englanti **2008**.
- ⁵⁷Camenicsh, G., Folkers, G. ja van de Waterbeemd, H. *Pharm. Acta Helv.* **1996**, *71*, 309–327.
- ⁵⁸McNamara, P. J. ja Leggas, M. *Drug Distribution*. Teoksessa Hacker, M., Bachmann, K. ja Messer, W. *Pharmacology – Principles and Practice*. Elsevier Inc., Yhdysvallat **2009**.
- ⁵⁹Barthe, L., Woodley, J. ja Houin, G. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1999**, *13*, 154–168.
- ⁶⁰Hörter, D. ja Dressman, J. B. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *25*, 3–14.
- ⁶¹Liu, X., Ma, R., Shen, J., Xu, Y., An, Y. ja Shi, L. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1307–1314.
- ⁶²Guarino, V. R. *Modulating Solubility Through Prodrugs for Oral and IV Drug Delivery*. Teoksessa Rautio, J. (toim.) *Prodrugs and Targeted Delivery – Towards Better ADME Properties*. WILEY-VH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2011**.
- ⁶³Budha, N. R., Frymoyer, A., Smelick, G. S., Jin, J. Y., Yago, M. R., Dresser, M. J., Holden, S. N., Benet, L. Z. ja Ware, J. A. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2012**, *92*, 203–213.
- ⁶⁴Thummel, K. E., Kunze, K. L. ja Shen, D. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *27*, 99–127.
- ⁶⁵Balaz, S. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1793–1899.
- ⁶⁶Greco, K. ja Bogner, R. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 2996–3018.
- ⁶⁷Albert, A. *Nat.* **1958**, *182*, 421–423.
- ⁶⁸Stella, V. J. *A Case for Prodrugs*. Teoksessa Stella, V. J., Borchardt, R. T., Hageman, M. J., Oliyai, R., Maag, H. ja Tilley, J. W. (toim.) *Prodrugs: Challenges and Rewards, Part I*. Springer, Yhdysvallat **2007**.
- ⁶⁹Savolainen, J. *Improvement of the Physicochemical Properties and Oral Bioavailability of Poorly Bioavailable Drugs by Cyclodextrin- and Prodrug-Technology*. Kuopio University Printing Office, Kuopio **2000**.
- ⁷⁰Haarala, R. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* **1995**, *111*, 530.

- ⁷¹Stella, V. J., Charman, W. N. A. ja Naringrekar, V. H. *Drugs*, **1985**, 29, 455–473.
- ⁷²Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T. ja Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, 7, 255–270.
- ⁷³Zawilska, J. B., Wojcieszak, J. ja Olejniczak, A. B. *Pharmacol. Rep.* **2013**, 65, 1–14.
- ⁷⁴Avula, S. G., Alexander, K. ja Riga, A. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, 99, 655–658.
- ⁷⁵Pujara, N. D. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2012**, 4, 18–23.
- ⁷⁶Wermuth, C. G. Preparation of Water-Soluble Compounds by Covalent Attachment of Solubilizing Moieties. Teoksessa Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2. painos. Elsevier Academic Press, Englanti **2003**.
- ⁷⁷Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. ja Testa, B. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 2393–2404.
- ⁷⁸Huttunen, K. M. ja Rautio, J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 2265–2287.
- ⁷⁹Verma, A., Verma, B., Prajapati, S. K. ja Tripathi, K. *Asian J. Research Chem.* **2009**, 2, 100–103.
- ⁸⁰Testa, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 338–344.
- ⁸¹Stella, V. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 111–114.
- ⁸²Peterson, L. W. ja McKenna, C. E. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, 6, 405–420.
- ⁸³Safadi, M., Oliyai, R. ja Stella, V. J. *Pharm. Res.* **1993**, 10, 1350–1355.
- ⁸⁴Baan, R., Grosse, Y., Straif, K., Secretan, B., El Ghissasi, F., Bouvard, V., Bendrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. ja Coglianò, V. *The Lancet Oncol.* **2009**, 10, 1143–1144.
- ⁸⁵Coglianò, V. J., Grosse, Y., Baan, R. A., Straif, K., Secretan, M. B. ja El Ghissasi, F. *Environ. Health Pers.* **2005**, 113, 1205–1209.
- ⁸⁶Dhreshwar, S. S. ja Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 4184–4193.
- ⁸⁷Vig, B. S., Huttunen, K. M., Laine, K. ja Rautio, J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012** (painossa), DOI 10.1016/j.addr.2012.10.001.
- ⁸⁸Vig, B. ja Rautio, J. *Ther. Delivery* **2011**, 2, 959–962.

- ⁸⁹Huttunen, K. M., Raunio, H. ja Rautio, J. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750–771.
- ⁹⁰Wasserman, H. H. *Nature*, **2006**, *441*, 699–700.
- ⁹¹Powers, E. T., Deechongkit, S. ja Kelly, J. W. *Adv. Protein Chem.* **2006**, *72*, 39–78.
- ⁹²Carthew, H. L., Ziebell, J. M. ja Vink, R. *Neurosci.* **2012**, *214*, 78–83.
- ⁹³Stout, S. C., Owens, M. J. ja Nemeroff, C. B. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 877–906.
- ⁹⁴Diemunsch, P., Joshi, G. P. ja Brichant J.-F. *Br. J. Anaest.* **2009**, *103*, 7–13.
- ⁹⁵Chan, O. H., Schmid, H. L., Stilgenbauer, L. A., Howson, W., Horwell, D. C. ja Stewart, B. H. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1012–1018.
- ⁹⁶de Almeida Borges, V.R., Simon, A., Sena, A. R. C., Cabral, L. M. ja Sousa, V. P. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 535–544.
- ⁹⁷Pochopin, N. L., Charman, W. N. ja Stella, V. J. *Int. J. Pharm.* **1995**, *121*, 157–167.
- ⁹⁸Antonik, L. M., Khabibulina, A. G. ja Shulunova, A. M. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 1843.
- ⁹⁹Bundgaard, H., Larsen, C. ja Thorbek, P. *Int. J. Pharm.* **1984**, *18*, 67–77.
- ¹⁰⁰Ogata, H., Aoyagi, N., Kaniwa, N., Shibasaki, T., Ejima, E., Takagishi, Y., Ogura, T., Tomita, K., Inoue, S. ja Zaizen, M. *Int. J. Pharm.* **1985**, *23*, 277–288.
- ¹⁰¹Haynes, W. M., Bruno, T. J. ja Lide, D. R. (toim.) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 94. painos. CRC Press/Taylor and Francis, Yhdysvallat **2013**.
- ¹⁰²Andersson, I., Gorzsás, A., Kerezsi, C., Tóth, I. ja Pettersson, L. *Dalton T.* **2005**, *22*, 3658–3666.
- ¹⁰³Lopez, X., Schaefer, M., Dejaegere, A. ja Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5010–5018.
- ¹⁰⁴Schultz, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885–898.
- ¹⁰⁵Baldwin, D. S., Howitt, J. A. ja Beattie, J. K. *Abiotic Degradation of Organic Phosphorus Compounds in the Environment*. Teoksessa Turner, B. L., Frossard, E. ja Baldwin, D. S. (toim.) *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing, Iso-Britannia **2005**.

- ¹⁰⁶Hemenway, J. ja Stella, V. J. Prodrugs and Parenteral Drug Delivery. Teoksessa Stella, V. J., Borchardt, R. T., Hageman, M. J., Oliyai, R., Maag, H. ja Tilley, J. W. (toim.) Prodrugs: Challenges and Rewards, Part I. Springer, Yhdysvallat **2007**.
- ¹⁰⁷Heimbach, T., Oh, D.-M., Li, L. Y., Rodríguez-Hornedo, N., Garcia, G. ja Fleisher, D. *Int. J. Pharm.* **2003**, *261*, 81–92.
- ¹⁰⁸Müller, C. E. *Chem. Biodiversity* **2009**, *6*, 2071–2083.
- ¹⁰⁹Järvinen, T., Rautio, J., Masson, M. ja Loftsson, T. Design and Pharmaceutical Applications of Prodrugs. Teoksessa Gad, S. C. (toim.) Drug Discovery Handbook. John Wiley & Sons, Yhdysvallat **2005**.
- ¹¹⁰Stella, V. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *19*, 311–330.
- ¹¹¹Eriksson, K., Keränen, T. ja Kälviäinen, R. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *6*, 695–701.
- ¹¹²Leppänen, J., Huuskonen, J., Savolainen, J., Nevalainen, T., Taipale, H., Vepsäläinen, J., Gynther, J. ja Järvinen, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1967–1969.
- ¹¹³Ibbotson, T. ja Goa, K. L. *Dis. Manag. Health Out.* **2002**, *10*, 643–659.
- ¹¹⁴Keränen, T., Gordin, A., Karlsson, M., Korpela, K., Pentikäinen, P. J., Rita, H., Schultz, E., Seppälä, L. ja Wikberg, T. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *46*, 151–157.
- ¹¹⁵Savolainen, J., Forsberg, M., Taipale, H., Männistö, P. T., Järvinen, K., Gynther, J., Jarho, P. ja Järvinen, T. *Drug Dev. Res.* **2000**, *49*, 238–244.
- ¹¹⁶Chapman, T. M., Plosker, G. L. ja Perry, C. M. *Drugs*, **2004**, *18*, 2101–2124.
- ¹¹⁷Furfine, E. S., Baker, C. T., Hale, M. R., Reynolds, D. J., Salisbury, J. A., Searle, A. D., Studenberg, S. D., Todd, D., Tung, R. D. ja Spaltenstein, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 791–798.
- ¹¹⁸Wood, R., Arasteh, K., Pollard, R., Kaur, P., Naderer, O. ja Wire, M. B. *8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections – Poster.* **2001**.
- ¹¹⁹Falcoz, C., Jenkins, J. M., Bye, C., Hardman, T. C., Kenney, K. B., Studenberg, S., Fuder, H. ja Prince, W. T. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 887–898.

- ¹²⁰Ouyang, H. Case Study: Fosamprenavir: A Prodrug of Amprenavir. Teoksessa Stella V. J., Borchardt, R. T., Hageman, M. J., Oliyai, R., Maag, H. ja Tilley, J. W. (toim.) Prodrugs: Challenges and Rewards, Part II. Springer, Yhdysvallat **2007**.
- ¹²¹Perry, C. M. ja McTavish, D. *Drug. Aging*, **1995**, *1*, 49–74.
- ¹²²Bergenheim, A. T. ja Henriksson, R. *Clin. Pharmacokinet.* **1998**, *2*, 163–172.
- ¹²³Ravery, V., Fizazi, K., Oudard, S., Drouet, L., Eymard, J.-C., Culine, S., Gravis, G., Hennequin, C. ja Zerbib, M. *BJU Int.* **2011**, *108*, 1782–1786.
- ¹²⁴Derendorf, H., Möllmann, H., Rohdewald, P., Rehder, J. ja Schmidt, W. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1985**, *37*, 502–507.
- ¹²⁵Möllmann, H., Rohdewald, P., Barth, J., Möllmann, C., Verho, M. ja Derendorf, H. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 509–513.
- ¹²⁶Vansant, G., Trauger, R. J., Cameron, A., Vendemelio, M., Kreitschitz, S., Carlo, A. T., Banaszczyk, M. G., Carlo, D. J., Hendler, S. ja Ill, C. R. *Autoimmunity* **2007**, *40*, 180–186.
- ¹²⁷Trapani, A., Laquintana, V., Lopedota, A., Franco, M., Latrofa, A., Talani, G., Sanna, E., Trapani, G. ja Liso, G. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 91–98.
- ¹²⁸Miyabo, S., Nakamura, T., Kuwazima, S. ja Kishida, S. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *20*, 277–282.
- ¹²⁹Williams, D. B., Varia, S. A., Stella, V. J. ja Pitman, I. H. *Int. J. Pharm.* **1983**, *14*, 113–120.
- ¹³⁰Doh, M. J., Jung, Y. J., Kim, I. H., Kong, H. S. ja Kim, Y. M. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 258–263.
- ¹³¹Kim, I. H., Kong, H. S., Choi, B. I., Kim, Y. S., Kim, H. J., Yang, Y. W., Jung, Y. J. ja Kim, Y. M. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 389–397.
- ¹³²Fendler, E. J. ja Fendler, J. H. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3852–3859.
- ¹³³Regosz, A., Chmielewska, A., Pelplinska, T. ja Kowalski, P. *Pharmazie* **1994**, *49*, 371–374.
- ¹³⁴Dilova, V., Zlatarova, V., Spirova, N., Filcheva, K., Pavlova, A. ja Grigorova, P. *Boll. Chim. Farm.* **2004**, *143*, 20–23.

- ¹³⁵Savolainen, J., Leppänen, J., Forsberg, M., Taipale, H., Nevalainen, T., Huuskonen, J., Gynther, J., Männistö, P. T. ja Järvinen, T. *Life Sci.* **2000**, *67*, 205–216.
- ¹³⁶Forsberg, M., Savolainen, J., Järvinen, T., Leppänen, J., Gynther, J. ja Männistö, P. T. *Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *90*, 327–332.
- ¹³⁷Wikberg, T. Biotransformation and bioanalytics of nitecapone and entacapone. Yliopistopaino, Helsinki **1993**.
- ¹³⁸Halen, P. K., Murumkar, P. R., Giridhar, R. ja Yadav, M. R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 124–139.
- ¹³⁹Wiwattanawongsa, K., Tantishaiyakul, V., Lomlim, L., Rojanasakul, Y., Pinsuwan, S. ja Keawnopparat, S. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 721–727.
- ¹⁴⁰Swathi, C. H., Subrahmanyam, C. V. S., Kedarnath, S. A. ja Sathesh Babu, P. R. *Int. J. Pharm. Tech.* **2011**, *3*, 3267–3276.
- ¹⁴¹Ichikawa, T., Kitazaki, T., Matsushita, Y., Yamada, M., Hayashi, R., Yamaguchi, M., Kiyota, Y., Okonogi, K. ja Itoh, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1102–1109.
- ¹⁴²Leu, Y.-L., Roffler, S. R. ja Chern, J.-W. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3623–3628.
- ¹⁴³Cragg, G. M. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 315–331.
- ¹⁴⁴Mikuni, K., Nakanishi, K., Hara, K., Hara, K., Iwatani, W., Amano, T., Nakamura, K., Tsuchiya, Y., Okumoto, H. ja Mandai, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1155–1158.
- ¹⁴⁵Ma, P. ja Mumper, R. J. *J. Nanomedicine Nanotech.* **2013**, *4*, 1–16.
- ¹⁴⁶de Bont, D. B. A., Leenders, R. G. G., Haisma, H. J., van der Meulen-Muileman, I. ja Scheere, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 405–414.
- ¹⁴⁷Singla, A. K., Garg, A. ja Aggarwal, D. *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 179–192.
- ¹⁴⁸Nikolakakis, A., Haidara, K., Sauriol, F., Mamer, O. ja Zamir, L. O. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1551–1556.
- ¹⁴⁹Leenders, R. G. G., Gerrits, K. A. A., Ruijtenbeek, R. ja Scheeren, H. W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1701–1704.
- ¹⁵⁰Zamir, L. O., Cherestes, A. D., Nikolakakis, A., Sauriol, F. ja Mamer, O. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7917–7920.

- ¹⁵¹Chung, Y. ja Cho, H. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 878–883.
- ¹⁵²Banerjee, S. S., Aher, N., Patil, R. ja Khandare, J. *J. Drug Delivery* **2012**, *2012*, 1–17.
- ¹⁵³Greenwald, R. B., Choe, Y. H., McGuire, J. ja Conover, C. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217–250.
- ¹⁵⁴Min, T., Ye, H., Zhang, P., Liu, J., Zhang, C., Shen, W., Wang, W. ja Shen, L. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *111*, 444–451.
- ¹⁵⁵Greenwald, R. B., Pendri, A., Conover, C. D., Zhao, H., Choe, Y. H., Martinez, A., Shum, K. ja Guan, S. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657–3667.
- ¹⁵⁶Greenwald, R. B., Choe, Y. H., Conover, C. D., Shum, K., Wu, D. ja Royzen, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 475–487.
- ¹⁵⁷Zhao, L., Guo, Q.-L., You, Q.-D., Wu, Z.-Q. ja Gu, H.-Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 998–1003.
- ¹⁵⁸Ding, Y., Zhang, P., Tang, X.-Y., Zhang, C., Ding, S., Ye, H., Ding, Q.-L., Shen, W.-B. ja Ping, Q.-N. *Polymer* **2012**, *53*, 1694–1702.
- ¹⁵⁹Kim, Y. H., Hirabayashi, M., Togashi, Y., Hirano, K., Tomii, K., Masago, K., Kaneda, T., Yoshimatsu, H., Otsuka, K., Mio, T., Tomioka, H., Suzuki, Y. ja Mishima, M. *Cancer Chemoth. Pharm.* **2012**, *70*, 271–276.
- ¹⁶⁰D’Addario, G., Früh, M., Reck, M., Baumann, P., Klepetko, W. ja Felip, E. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 116–119.
- ¹⁶¹Keller, O., Keller, W. E., van Look, G. ja Wersin, G. *Org. Synth.* **1985**, *63*, 160.
- ¹⁶²Zalipsky, S., Gilon, C. ja Zilkha, A. *J. Macromol. Sci.* **1984**, *21*, 839–845.
- ¹⁶³Patel, P. Patel, H., Panchal, S. ja Mehta, T. *Int. J. Pharm. Invest.* **2012**, *2*, 169–175.
- ¹⁶⁴Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. ja Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1249–1255.
- ¹⁶⁵Wakamiya, T., Tarumi, Y. ja Shiba, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974**, *47*, 2686–2689.
- ¹⁶⁶Sohma, Y., Hayashi, Y., Skwarczynski, M., Hamada, Y., Sasaki, M., Kimura, T. ja Kiso, Y. *Biopolymers*, **2004**, *76*, 344–356.
- ¹⁶⁷Kiso, Y., Matsumoto, H., Yamaguchi, S. ja Kimura, T. *Lett. Pept. Sci.* **1999**, *6*, 275–281.

- ¹⁶⁸Hamada, Y., Ohtake, J., Sohma, Y., Kimura, T., Hayashi, Y. ja Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 4155–4167.
- ¹⁶⁹Mimoto, T., Hattori, N., Takaku, H., Kisanuki, S., Fukazawa, T., Terashima, K., Kato, R., Nojima, S., Misawa, S., Ueno, T., Imai, J., Enomoto, H., Tanaka, S., Sakikawa, H., Shintani, M., Hayashi, H. ja Kiso, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1310–1326.
- ¹⁷⁰Mamidi, R. N. V. S., Mullangi, R., Kota, J., Bhamidipati, R., Khan, A. A., Katneni, K., Datla, S., Singh, S. K., Rao, K. Y., Rao, C. S., Srinivas, N. R. ja Rajagopalan, R. *Biopharm. Drug Dispos.* **2002**, *23*, 273–282.
- ¹⁷¹Singh, S. K., Vobbalareddy, S., Kalleda, S. R., Casturi, S. R., Datla, S. R., Mamidi, R. N. V. S., Mullangi, R., Ramanujam, R., Yeleswarapu, K. R. ja Iqbal, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8626–8634.
- ¹⁷²Davies, N. M. ja Watson, M. S. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *6*, 437–459.
- ¹⁷³Krishnaiah, Y. S. R. *J. Bioequiv. Availab.* **2010**, *2*, 28–36.
- ¹⁷⁴Singh, A., Worku, Z. A. ja van den Mooter, G. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 1361–1378.
- ¹⁷⁵Serajuddin, A. D. M. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1058–1066.
- ¹⁷⁶Miyoshi, T., Matsuda, A., Amino, M., Kataoka, M. ja Sato, M. *Yakuzaigaku* **1997**, *57*, 174–180.
- ¹⁷⁷Kai, T., Akiyama, Y., Nomura, S. ja Sato, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 568–571.
- ¹⁷⁸Buchanan, C. M., Buchanan, N. L., Edgar, K. J., Klein, S., Little, J. L., Ramsey, M. G., Ruble, K. M., Wachter, V. J. ja Wempe, M. F. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 3100–3116.
- ¹⁷⁹Jung, J.-Y., Yoo, S. D., Lee, S.-H., Kim, K.-H., Yoon, D.-S. ja Lee, K.-H. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 209–218.
- ¹⁸⁰Tinwell, H., Colombel, S., Blanck, O. ja Bars, R. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *66*, 184–196.
- ¹⁸¹Andini, S., Bolognese, A., Formisano, D., Manfra, M., Montagnaro, F. ja Santoro, L. *Chemosphere* **2012**, *88*, 548–553.
- ¹⁸²Kocbek, P., Baumgartner, S. ja Kristl, J. *Int. J. Pharm.* **2006**, *312*, 179–186.
- ¹⁸³Bhargava, P., Bhargava, S. ja Daharwal, S. J. *Adv. Res. Pharm. Biol.* **2011**, *1*, 1–9.

- ¹⁸⁴Ayushi, T., Faraz, J., Ritika, S. ja Saurabh, S. *Int. Res. J. Pharm.* **2012**, *3*, 32–36.
- ¹⁸⁵Toropainen, T. Cyclodextrins and Their Solid-State Complexes – Studies for Pulmonary Drug Delivery. Kopijyvä, Kuopio **2008**.
- ¹⁸⁶Loftsson, T. ja Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- ¹⁸⁷Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.
- ¹⁸⁸Loftsson, T. ja Duchêne, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 1–11.
- ¹⁸⁹Upadhye, S. B., Kulkarni, S. J., Majumdar, S., Avery, M. A., Gul, W., ElSohly, M. A. ja Repka, M. A. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2010**, *11*, 509–517.
- ¹⁹⁰Rajewski, R. A. ja Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1142–1169.
- ¹⁹¹Stella, V. J. ja Rajewski, R. A. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 556–567.
- ¹⁹²Miller, L. A., Carrier, R. L. ja Ahmed, I. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1691–1707.
- ¹⁹³Nagel, N., Schweitzer, H., Urbach, H., Heyse, W., Muller, B. ja Berchtold, H. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2001**, *57*, 463–465.
- ¹⁹⁴Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K. ja Ali, M. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 227–243.
- ¹⁹⁵Jagdale, S. C., Dangat, Y. T. ja Kuchekar, B. S. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2013**, *6*, 83–90.
- ¹⁹⁶Archer, R. A. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1974**, *9*, 253–259.
- ¹⁹⁷Zhu, Z., Chen, H.-G., Goel, O. P., Chan, O. H., Stilgenbauer, L. A. ja Stewart, B. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1121–1124.
- ¹⁹⁸Hadimani, M. B., Hua, J., Jonklaas, M. D., Kessler, R. J., Sheng, Y., Olivares, A., Tanpure, R. P., Weiser, A., Zhang, J., Edvardsen, K., Kane, R. R. ja Pinney, K. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1505–1508.
- ¹⁹⁹Mäntylä, A., Vepsäläinen, J., Järvinen, T. ja Nevalainen, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3793–3794.
- ²⁰⁰Chassaing, C., Berger, M., Heckerroth, A., Ilg, T., Jaeger, M., Kern, C., Schmid, K. ja Uphoff, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1111–1114.
- ²⁰¹Haddach, M., Ryckman, D. ja Raffaele, N. *WO2011031979A1*, **2011**, 1–235.

- ²⁰²Liljeblad, A. Toward Enantiomers of Di- and Trifunctional Carboxylic Esters by Acylase I and Lipases A and B from *Candida Antarctica*; Studies on Enantio-, Chemo- and Regioselectivity. Painosalama Oy, Turku **2004**.
- ²⁰³Dea-Ayuela, M. A., Castillo, E., Gonzalez-Alvarez, M., Vega, C., Rolón, M., Bolás-Fernández, F., Borrás, J. ja González-Rosende, M. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7449–7456.
- ²⁰⁴Ullmann, F. ja Bielecki, J. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* **1901**, *34*, 2174–2185.
- ²⁰⁵Kürti, L. ja Czakó, B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and Detailed Mechanisms. Elsevier Academic Press, San Diego **2005**.
- ²⁰⁶Ma, D. ja Xia, C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2583–2586.
- ²⁰⁷Louie, J. ja Hartwig, J. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609–3612.
- ²⁰⁸Guram, A. S., Rennels, R. A. ja Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348–1350.
- ²⁰⁹Surry, D. S. ja Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27–50.
- ²¹⁰Bhanushali, M. J., Nandurkar, N. S., Bhor, M. D. ja Bhanage, B. M. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2006**, *259*, 46–50.
- ²¹¹Chen, L., Yu, G.-A., Li, F., Zhu, X., Zhang, B., Guo, R., Li, X., Yang, Q., Jin, S., Liu, C. ja Liu, S.-H. *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 1768–1775.
- ²¹²Huang, H., Liu, H., Jiang, H. ja Chen, K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6037–6040.
- ²¹³Monguchi, Y., Kitamoto, K., Ikawa, T., Maegawa, T. ja Sajiki, H. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2767–2777.
- ²¹⁴Shen, Q., Shekhar, S., Stambuli, J. P. ja Hartwig, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1371–1375.
- ²¹⁵Tewari, A., Hein, M., Zapf, A. ja Beller, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9705–9709.
- ²¹⁶Xie, X., Zhang, T. Y. ja Zhang, Z. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6522–6529.
- ²¹⁷Csomós, P., Kanerva, L. T., Bernáth, G. ja Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1996**, *7*, 1789–1796.

- ²¹⁸Ohta, H., Yuyama, Y., Uozumi, Y. ja Yamada, Y. M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3892–3895.
- ²¹⁹Krise, J. P., Zygmunt, J., Georg, G. I. ja Stella, V. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3094–3100.
- ²²⁰Heimbach, T., Oh, D-M., Li, L. Y., Rodriguez-Hornedo, N., Garcia, G. ja Fleisher, D. *Int. J. Pharm.* **2003**, *261*, 81–92.
- ²²¹Jadhav, P. K., Woerner, F. J. ja Aungst, B. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2259–2262.

Käytetyt reagenssit ja liuottimet

| Nimi | Mahdollinen lyhenne | Molekyylikaava | Tuotekoodi | Lot | Valmistaja |
|---|---------------------|---------------------|------------|------------|----------------|
| 1,1'-bis(difenyylifosfiino)ferroseeni, 98 % | dppf | $C_{34}H_{28}FeP_2$ | 177261-1G | 09002DJV | Sigma-Aldrich |
| 1,2,2,6,6-pentametyyli-piperidiini, 97 % | PEMP | $C_{10}H_{21}N$ | H27729 | 10159380 | Alfa Aesar |
| 2-metyylitetrahydrofuraani, 99+ % | 2-MeTHF | $C_5H_{10}O$ | 414247-1L | 00246JD | Sigma-Aldrich |
| 2-amino-4,6-dimetyylipyrimidiini, 98 % | | $C_6H_9N_3$ | 103590250 | A0249739 | Acros Organics |
| 2-metyylibentsoyliamiini, 96 % | | $C_8H_{11}N$ | 127132-5G | 1426171 | Sigma-Aldrich |
| 2-metyylibentsoylibromidi, 98 % | | C_8H_9Br | B83401-25G | 51797MJ | Sigma-Aldrich |
| 2-propanoli, $\geq 99,8$ % | | C_3H_8O | 34863-2.5L | SZBB035A V | Sigma-Aldrich |
| 4-bromibentseenisulfonyylikloridi, 98 % | | $C_6H_4ClBrO_2S$ | 148760250 | A0272543 | Acros Organics |
| 4-N,N-dimetyyliaminopyridiini, 99 % | DMAP | $C_7H_{10}N_2$ | 10,770-0 | 22931-038 | Sigma-Aldrich |
| 4-klooribentseenisulfonyylikloridi, 97 % | | $C_6H_4Cl_2O_2S$ | 158561000 | A0286374 | Acros Organics |
| Ammoniumhydroksidi, 24,5 % | | NH_4OH | 6051 | 0920904913 | J.T. Baker |

| | | | | | |
|--|--------------------|--|---|-----------------|----------------------|
| Aniliini, 99,5+ % | | C ₆ H ₇ N | 242284- 100G | 10420MD | Sigma- Aldrich |
| Asetoni | | C ₃ H ₆ O | 32201N- 2.5L | SZBA1720 | Sigma- Aldrich |
| Asetonit- riili, ≥ 99,9 % | CH ₃ CN | C ₂ H ₃ N | 34851N- 2.5L | SZBB067B V | Sigma- Aldrich |
| Bentsyyli- amiini, 99 % | | C ₇ H ₉ N | 185701- 100G | STBC2421 V | Sigma- Aldrich |
| Bis(dibentsy- lideeniasetoni) palladium(0) | | Pd(dba) ₂ | C ₃₄ H ₂₈ O ₂ Pd | 227994-2G | MKBF7542V |
| Cesiumkarbo- naatti, 99 % | | Cs ₂ CO ₃ | 44,190-2 | S84047 | Sigma- Aldrich |
| Deuteroitu kloroformi | | CDCl ₃ | 151823- 250G | MKAA417 3 | Sigma- Aldrich |
| Dibentsyyli- fosfaatti, 99 % | | C ₁₄ H ₁₅ O ₄ P | D36550-5G | S28972 | Sigma- Aldrich |
| Dibutyylifos- faatti, ≥ 97 % | | C ₈ H ₁₉ O ₄ P | 68572- 250ML | BCBC2174 | Sigma- Aldrich |
| Dietyylieetteri, ≥ 99,8 % | | C ₄ H ₁₀ O | 32203 | SZBA167S | Sigma- Aldrich |
| Dikloorime- taani, ≥ 99,9 % | DCM | CH ₂ Cl ₂ | 32222N- 2.5L | SZBB0800 V | Sigma- Aldrich |
| Dimetoksi- etaani, 99+ % | DME | C ₄ H ₁₀ O ₂ | 93417 | E2,740-8 | Sigma- Aldrich |
| Dimetyyli- sulfoksidi | DMSO | (CD ₃) ₂ SO | 175943- 50G | MKBD8520 V | Sigma- Aldrich |
| Dimetyyli- sulfoksidi | DMSO | (CH ₃) ₂ SO | S37057242 | 8.02912100 0 | VWR International |
| Etanoli | EtOH | C ₂ H ₅ OH | 12221243 | UN1170 | Altia Oyj |

| | | | | | |
|---|------|--|-------------------|--------------------------------|-------------------|
| Etikkahappo, 99–100 % | | CH ₃ COOH | 6052 | 9919010014 | J.T. Baker |
| Etikkahappo- anhydridi, ≥ 98 % | | C ₄ H ₆ O ₃ | 45840 | 1378411 | Fluka |
| Etyleenibis- (difenyylifos- fiini), 99 % | dppe | C ₂₆ H ₂₄ P ₂ | 376728-5G | 1438249V | Sigma- Aldrich |
| Etyyliasettaatti, ≥ 99,5 % | | C ₄ H ₈ O ₂ | 33211N- 2.5L-R | SZBB0170 V | Sigma- Aldrich |
| Fosforihappo, 85 % | | H ₃ PO ₄ | 573 | K1195173 | Merck |
| Heksaani, ≥ 97 % | | C ₆ H ₁₄ | 34859-2.5L | SZBB070M V | Sigma- Aldrich |
| Hopeaoksidi, 99 % | | Ag ₂ O | 22,116-3 | CR09915A R | Sigma- Aldrich |
| Kaliumfluori- di, 99 % (vedetön) | | KF | 20135-2500 | A01017430 2 | Acros Organics |
| Kaliumkarbo- naatti (vedetön) | | K ₂ CO ₃ | 0204 | N10149 | J.T. Baker |
| Kloori- metyyli- kloorisulfaatti, 97 % | | CH ₂ Cl ₂ O ₃ S | 656682-2G | 01203HJV/ MKBF4234 V | Sigma- Aldrich |
| Kupari | | Cu | 2715 | 935473 | Merck |
| Kuparijodidi* | | CuI | | | |
| Kupari(I)klo- ridi, 98 %** | | CuCl | | | |
| Kupari(II)klo- ridi | | CuCl ₂ | 2733 | A496333 | Merck |
| Magnesium- sulfaatti | | MgSO ₄ | 0366 | E45590 | Sigma- Aldrich |

| | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|---|---------------|----------------------|-------------------|
| Metanoli | MeOH | CH ₃ OH | 34860N-2.5L-R | SZBA3645 V | Sigma-Aldrich |
| <i>N,N</i> -dimetyyli-formamidi | DMF | C ₃ H ₇ NO | 23466.298 | 10A210507 | VWR International |
| Natriumhydridi | | NaH | 45,291-2 | 26650-019 / STBB3117 | Sigma-Aldrich |
| Natriumjodidi, 99+ % (vedetön) | | NaI | 203182500 | A01260990 1 | Acros Organics |
| Natriumkloridi, 0,9 % | | NaCl | 01-63-14-008 | 07AA15 | Fresenius Kabi |
| Natriummetoksidi | NaOMe | CH ₃ ONa | 93/217156 | | Hüls |
| Natriumsulfaatti (vedetön) | | Na ₂ SO ₄ | 0312 | E43602 | J.T. Baker |
| Natriumvetykarbonaatti | | NaHCO ₃ | 0263 | 0731901045 | J.T. Baker |
| Palladium(II)-asettaatti, 98 % | Pd(OAc) ₂ | C ₄ H ₆ O ₄ Pd | 683124-5G | STBC3594 V | Sigma-Aldrich |
| Paraformaldehydi | | HO(CH ₂ O) _n H | P6148-500G | 056K1528 | Sigma-Aldrich |
| Petrolieetteri, ≥ 95 % | | | 77379-2.5L | BCBO4038 V | Sigma-Aldrich |
| Pyridiini | | C ₅ H ₅ N | 8073 | 0330010003 | J.T. Baker |
| Rikkihappo, 95–97 % | | H ₂ SO ₄ | 30743 | SZBA1980 | Sigma-Aldrich |
| Sitruunahappo | | C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O | 242 | 8519574 | Merck |
| Sulfame-tatsiini | | C ₁₂ H ₁₃ N ₄ NaO ₂ S | S5637-100G | BCBB6419 | Sigma-Aldrich |
| Suolahappo, 37 % | | HCl | 20255.420 | 10D260025 | VWR International |

Liite 1

| | | | | | |
|---|-----|--|------------------|------------------|-----------------|
| Tetrabutyyliammoniumvetysulfaatti, 97 % | | $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{N}$ (HSO_4) | 15,583-7 | STBB0331 | Sigma-Aldrich |
| Tetrahydrofuraani | THF | $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ | 9441 | 0728202028 | J.T. Baker |
| Trietyyliammiini, $\geq 99,5$ % | TEA | $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ | 90340-1L | 0001434067 | Sigma-Aldrich |
| Tolueneeni | | C_7H_8 | K30464225 212 | 1.08325.250 0 | Merck |
| Tween 80 (Polysorbaatti 80) | | | | S52648879 06 | Merck |
| Vanilliini | | $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ | 14.082.17 | 47727/5 | Janssen Chimica |
| Vesi | | | | | |

*Kuparijodidi ei ollut alkuperäisessä purkissa.

**Kupari(I)kloridi ei ollut alkuperäisessä purkissa.