

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut

Heleri Heike Härk

Asa-aminohappe struktuuri mõju asa-peptiidi sünteesile
kasutades aktivaatorit trifosgeen

Magistritöö (30 EAP)

Keemia

Juhendaja: Anu Ploom, PhD

Tartu 2020

Asa-aminohappe struktuuri mõju asa-peptiidi sünteesile kasutades aktivaatorit trifosgeen

Asa-peptiidid on peptidomimeetikud, mis on arendatud vältimaks takistusi, mis esinevad peptiidide kasutamisel ravimikandidaatidena. Olemasolevad meetodid ei võimalda aga asa-peptiidide sünteesi sobiva saagisega. Käesolevas magistritöös uuriti asa-aminohappe (asaGly, asaAla, asaLeu, asaVal) struktuuri mõju sidumisreaktsiooni efektiivsusele mudel asa-peptiidis H-asaAH-Ala-Phe-NH₂ aktivaatoriga BTC. Lisaks uuriti ühe asa-aminohappe (asaAla) dipeptiidile H-Val-Phe-NH₂ sidumise näitel, kas lisatavale asa-aminohappele eelneva aminohappe struktuur mõjutab sidumise efektiivsust. Selgus, et seotava asa-aminohappe ega sellele järjestuses eelneva aminohappe kõrvalahela struktuur praktiliselt ei mõjuta sidumisreaktsiooni kiirust ning mõjutab reaktsiooni saagist väga vähesel määral. Seega võib asa-aminohapete lisamiseks peptiidjärjestusse aktivaatoriga BTC rakendada ühesugust eeskirja sõltumata asa-aminohappe või sellele eelneva aminohappe alküül-kõrvalahela struktuurist. AsaGly sidumiseks peptiidjärjestusse on aga sobivam kasutada aktivaatorit DSC.

Märksõnad: Asa-peptiidid, BTC, DSC, kineetika, SPPS, trifosgeen

P390 – Orgaaniline keemia

Influence of aza-amino acid structure on aza-peptide synthesis using triphosgene as an activator

Aza-peptides are peptidomimetics which are developed to avoid obstacles while using peptides as drug candidates. Currently existing methods do not provide aza-peptides with sufficient yield. The aim of this research was to evaluate the impact of aza-amino acid structure (azaGly, azaAla, azaLeu, azaVal) to the coupling efficiency, using BTC as an activator in model aza-peptide H-azaAla-Ala-Phe-NH₂. In addition, the impact of the side chain steric bulkiness of amino acid residue preceding the coupled aza-amino acid was also examined, comparing the efficiency of azaAla coupling to the dipeptides H-Ala-Phe-NH₂ and H-Val-Phe-NH₂. Results of kinetic measurements indicated that the side chain of aza-amino acid or amino acid preceding aza-amino acid have no impact on the rate nor yield of the coupling reaction. Hence, while utilizing BTC, the same method can be used for the coupling of aza-amino acids, regardless of aza-amino acid or preceding amino acid side chain bulkiness. On the other hand, effective coupling of azaGly was obtained using an alternative method, which utilizes DSC.

Keywords: Aza-peptides, BTC, DSC, kinetics, SPPS, triphosgene

P390 – Organic chemistry

Sisukord

Töös kasutatud lühendid	4
1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1 Asa-peptiidid	7
2.2 Tahkefaasiline peptiidsüntees (SPPS)	9
2.2.1 Kaitserühmad	11
2.2.2 Aktivaatorid	14
2.3 Tahkefaasiline asa-peptiidsüntees	17
2.3.1 Asa-glütsiini peptiidjärjestusse lisamine	20
3. Eksperimentaalne osa	21
3.1 Reaktiivid, töövahendid ja aparatuur	21
3.2.1 Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Val-Phe-NH-vaik sünteesid	22
3.2.2 Kineetilised mõõtmised mudel asa-peptiidi H-asaAH-Ala-Phe-NH-vaik sünteesil	22
3.2.3 H-asaGly-Ala-Phe-NH ₂ süntees	25
3.2.4 Asa-tripeptiidi H-asaAla-Val-Phe-NH ₂ süntees ja kineetilised mõõtmised	26
4. Tulemused ja arutelu	27
4.1 Dipeptiidide Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Val-Phe-NH-vaik süntees	27
4.2 Fosgeenijääkide eemaldamise mõju asa-tripeptiidi H-asaAla-Ala-Phe-NH ₂ sünteesile	28
4.3 Asa-aminohappe struktuuri mõju H-asaAH-Ala-Phe-NH ₂ sünteesile	30
4.3.1 Fmoc-asaGly sidumine dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik	32
4.4 Asa-aminohappele eelneva aminohappe struktuuri mõju H-asaAla-AH-Phe-NH ₂ sünteesile	38
5. Kokkuvõte	39
Summary	40
Kasutatud kirjandus	41
Tänuavaldused	46
Lisad	47

Töös kasutatud lühendid

<u>Lühend</u>	<u>Inglisekeelne nimetus</u>	<u>Eestikeelne nimetus</u>
ACN	Acetonitrile	Atsetonitriil
AH	Amino acid	Aminohape
Ala	Alanine	Alaniin
Boc	Butyloxycarbonyl	Butüüloksükarbonüül
Bzl	Benzyl	Bensüül
BTC	Bis(trichloromethyl)carbonate	Bis(triklorometüül)karbonaat
CD36	Cluster of differentiation 36	Diferentseerimise klaster 36
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazole	<i>N,N'</i> -Karbonüüldiimidasool
COMU	1-((1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)-dimethylamino-morpholinomethylene)) methanaminium hexafluorophosphate	1-((1-(Tsüano-2-etoksü-2-oksoetülideenaminooksü)-dimetüülamino-morfolinometüleen)) metaanamiinium heksafluorofosfaat
DCM	Dichloromethane	Diklorometaan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine	<i>N,N</i> -Diisopropüületüülamiin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	<i>N,N</i> -Dimetüülformamiid
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidyl carbonate	<i>N,N'</i> -Disuktsiinimidüülkarbonaat
Et	Ethyl	Etüül
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	9-Fluorenüülmetoksükarbonüül
GHRP-6	Growth hormone-releasing peptide 6	Kasvuhormooni vabastav peptiid 6
Gly	Glycine	Glütsiin
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	<i>O</i> -(Bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
Hmb	<i>N</i> -2-Hydroxy-4-methoxybenzyl	<i>N</i> -2-Hüdroksü-4-metoksübensüül
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	1-Hüdroksübensotriasool
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography - mass spectrometry	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia - massispektromeetria
KT	Kaiser's test	Kaiseri test
Leu	Leucine	Leutsiin
MBHA	4-Methylbenzhydramine	4-Metüülbensüülhüdrüülamiin
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7	Michigani Vähifond-7
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone	<i>N</i> -metüül-2-pürrolidoon
PA	Polyamide	Polüamiid

PE-PS	Polyethylene-polystyrene	Polüetüleen-polüstüreen
PEG	Polyethylene glycol	Polüetüleenglükool
PEGA	Polyethylene glycol acrylamide	Polüetüleenglükoolakrüülamiid
PEG-PS	Polyethylene glycol-polystyrene	Polüetüleenglükool-polüstüreen
PS	Polystyrene	Polüstüreen
Phe	Phenylalanine	Phe
PyOxim	<i>O</i> -((Cyano(ethoxycarbonyl)methyliden)-amino)-yloxytri (pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate	<i>O</i> -((Tsüano(etoksükarbonüül)metüülideen)-amino)-üülöksütri (pürrolidino)fosfoonium heksafluorofosfaat
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases	Teisene mitokondritest tuletatud kaspaside aktivaator
SPPS	Solid-phase peptide synthesis	Tahkefaasiline peptiidsüntees
<i>t</i> -Bu	Tertiary butyl	Tertsiaarne butüül
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborate	<i>O</i> -(Bensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroetaanhape
THF	Tetrahydrofurane	Tetrahüdrofuraan
TiS	Triisopropylsilane	Triisopropüülsilaan
TLC	Thin-layer chromatography	Õhukese kihi kromatograafia
TMR	Nuclear magnetic resonance	Tuumamagnetresonantsspektroskoopia
UV-Vis	Ultraviolet-visible	Ultravioletne-nähtav
Val	Valine	Valiin

1. Sissejuhatus

Peptiididel on mitmetes looduses esinevates protsessides erinevaid funktsioone, mis loovad eeldused nende kasutamiseks potentsiaalsete ravimikandidaatidena. Peptiidide kiire ensümaatilise degradatsiooni ning madala selektiivsuse ja biosaadavuse tõttu organismis on hakatud arendama peptidomimeetikuid [1-3]. Üheks peptiidide modifitseerimise võimaluseks on α -süsiniku asendamine lämmastikuga ühes või mitmes aminohappejäägis, saades asa-peptiidid [4].

Meie uurimisgrupp töötab välja efektiivsemat meetodikat asa-peptiidide sünteesimiseks, sest olemasolevad meetodid ei võimalda nende sünteesi piisava saagisega ning see takistab asa-peptiidide kui ravimikandidaatide laiaulatuslikku uurimist. Kuigi asa-peptiidsünteesi kõige kriitilisemaks etapiks on asa-aminohappele järgneva aminohappe sidumine [5-7], selgus 2018. aastal meie grupis kaitstud bakalaureusetööst, et ka seni kasutusel olnud meetod asa-aminohappe sidumiseks tahke kandjaga seotud järjestusse aktivaatoriga trifosgeen (BTC) ei kulge lõpuni [5,6,8]. Kuigi BTC on mainitud protsessil enimkasutatud aktivaator, ei kajastu kirjanduse põhjal, et selle reaktsiooni läbiviimise meetodika osas oleks saavutatud optimaalseid tingimusi. Asa-aminohappe sidumist peptiidahelasse on läbi viidud rakendades erinevaid reaktsiooniaegu ning protseduuri kordamist reagentide juurde lisamise teel [5,6,9,10].

Reaktsioonivõime uurimise esialgsed tulemused näitavad, et asa-aminohappele järgneva aminohappe külghela steeriline takistus [11] mõjutab oluliselt selle sidumise efektiivsust: aminohappe Ala sidumine dipeptiidile H-asaAla-Phe-NH-vaik aktivaatoriga BTC [12] toimub umbes 3 korda kiiremini ning umbes 2 korda parema saagisega, kui aminohappe Val sidumine samale dipeptiidile. Veelgi suuremat mõju avaldab asa-aminohappe külghela steerilise takistuse suurenemine sellele järgmise aminohappe sidumise efektiivsusele. Asa-peptiidi mudelühendis H-Ala-asaAH-Phe-NH-vaik seotakse Ala aktivaatoriga COMU asaAla külge 5 korda kiiremini kui asaLeu külge. Asa-aminohapetest kõige mahukama asaVal külge ei õnnestunud Ala antud meetodil praktiliselt üldse siduda (avaldamata andmed).

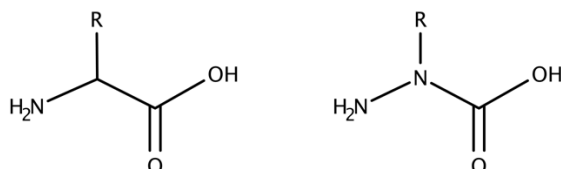
Töö eesmärgiks on läbi viia detailne kineetiline uurimus asa-aminohappe peptiidjärjestusse sidumise etapi efektiivsuse välja selgitamiseks mudel asa-peptiidis H-asaAH-Ala-Phe-NH₂, varieerides eelkõige asa-aminohapete kõrvalahela struktuuri. Lisaks on plaanis uurida ühe asa-aminohappe (asaAla) sidumise näitel mudel asa-peptiidis H-asaAla-Val-Phe-NH₂, kas lisatavale asa-aminohappele eelneva aminohappe struktuur mõjutab sidumise efektiivsust. Teadustöö tulemused aitavad kaasa asa-peptiidide sünteesimeetodika arendamisele.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Asa-peptiidid

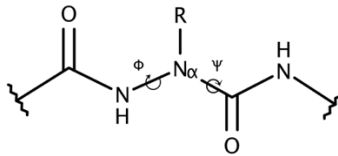
Peptiididel on täita oluline roll paljudes bioloogilistes ja füsioloogilistes protsessides funktsioneerides näiteks hormoonide, ensüümide inhibiitorite ja virgatsainetena [1-3,7,13]. Nende kasutamine ravimitena on aga piiratud madala rakumembraanide läbitavuse ja kiire proteolüütilise lagunemise tõttu [1-3]. Lisaks vähendab paljude peptiidide suur paindlikkus afiinsust ja selektiivsust retseptoritega seandumisel. Nimetatud probleemide lahendamiseks on võimalik kasutada peptiidide struktuurilist modifitseerimist [3].

Peptidomimeetikud on ühendid, mis jäljendavad peptiidide struktuuri, konformatsiooni või bioloogilist aktiivsust, samal ajal vältides peptiidide soovimatuid omadusi. Lisaks suuremale biostabiilsusele, võib paraneda näiteks ka retseptorselektiivsus, mis annab eelduse peptidomimeetikute kasutamiseks ravimiarenduses [7,14,15]. Peptiide on võimalik struktuuriliselt modifitseerida nii pea- kui ka kõrvalahelate kaudu, kuid paljulubavaks on osutunud α -süsiniku asendused põhiahelas, mis võimaldavad läbi muutunud elektrostaatiliste omaduste ja uute sekundaarsete konformatsioonide tekke luua täiustatud farmakokineetiliste omadustega peptiide [1,15].



Skeem 1. Aminohape (vasakul) ja asa-aminohape (paremal).

Asa-peptiidid on peptidomimeetikud, kus ühes või mitmes aminohappejäägis on α -süsinik asendatud lämmastikuga (**Skeem 1**) [4], mis toob kaasa kiraalsuse elimineerumise α -positsioonis ja vähendab karbonüülrühma elektrofiilsust, muutes geomeetria tetraeedrilisest trigonaal-planaarseks [1]. Sellise asenduse tagajärjel koosnevad ahelas omavahel asa-peptiidsidega seotud aminohappejäägid kahest struktuurielemendist. Nendeks on hüdrasiini osa, mis on kirjeldatav väändenurga ϕ kaudu ning uurea osa, mis on defineeritud peptiidi pöördenurga ψ poolt (**Skeem 2**) [3,13,15].



Skeem 2. Väände- (ϕ) ja pöördnurk (ψ) asa-peptiidis.

Asa-peptiidide korral on rotatsioonilised barjäärid suuremad kui vastavates tavapeptiidides ning väheneb peptiidi paindlikkus, sest pööratav C_{α} -C(O) side on asendunud jäiga uurea struktuuriga N_{α} -C(O) ning lisandunud on ka elektroonne tõukumine kahe kõrvutiasetseva lämmastiku aatomi vaba elektronpaari vahel [1,13,15]. Kuigi teoreetilised uurimused on näidanud, et mitteplanaarse struktuuriga konformeerid, kus lämmastike üksikud elektronpaarid paiknevad üksteise suhtes perpendikulaarselt, on hüdrasiinses osas eelistatud, siis uurea osa kaldub planaarsusele [3,16].

Kirjeldatud konformatsioonilised muutused välistavad β -lehtede tekke asa-peptiidide sekundaarstruktuuridena, kuid võimaldavad β -pöörde ning helikaalsete struktuuride teket [1,3,7,15]. Näiteks teatud proteaasid, mis seonduvad antiparalleelsete β -lehtede struktuuriga peptiidsubstraatidega, ei ole võimelised asa-peptiide lagundama. Seetõttu on asa-peptiidid potentsiaalseteks peptiidide ja valkude sekundaarstruktuuridel põhinevateks ravimikandidaatideks [15].

C_{α} aatomi asendamine lämmastiku aatomi vastu peptiidis toob kaasa muutused selle absorptsioonis, ensüüm- ja retseptorseondumises ning metaboolses stabiilsuses organismis [15]. Lisaks suurendab selline asendus peaaegu nii keemilist kui ka proteolüütilist stabiilsust [13,17]. Bioloogiliselt aktiivses peptiidis aminohappejääkide süstemaatilist asendamist nende asa-analoogidega kasutatakse bioaktiivsete ühendite arendamiseks struktuur-aktiivsus sõltuvuste uurimise kaudu ning erinevate valkude bioloogiliselt aktiivsete konformatsioonide identifitseerimiseks [2,18].

Asa-peptiidid võivad avaldada suuremat bioloogilist aktiivsust ja/või farmakokineetilisi omadusi võrreldes naturaalse peptiidiga [2,7]. Näiteks on heksapeptiid GHRP-6 asa-analoogid näidanud paremat selektiivsust ja afiinsust CD36 retseptorile seondumisel sõltuvalt asa-aminohappejäägi asukohast järjestuses [19,20]. Teise mitokondritest tuletatud kaspasid aktivaatori (Smac) üks asa-analoogidest suudab esile kutsuda rakusurma MCF-7 rinnavähi rakkudes originaalpeptiidist edukamalt [21]. Peptiidhormooni oksütotsiin asa-analoogide korral

on aga täheldatud nii efektiivsuse suurenemist kui ka vähenemist, sõltuvalt asa-aminohappejäägi asukohast peptiidis [15].

Samuti on avastatud, et aminohappejääkide asendamine asa-aminohappejääkidega naturaalse tsüsteiini proteaaside inhibiitorite seondumiskiirkondades parendab oluliselt nende inhibeerimisvõimet [22,23]. Asa-peptiide on kasutatud ka A-viirushepatiidi 3c, C-viirushepatiidi NS3 seriini ja HIV proteaaside inhibiitoritena [1]. Seega on asa-peptiidid oma erinevate bioloogiliste ja farmatseutiliste rakenduste tõttu pälvinud rohkelt tähelepanu [2].

2.2 Tahkefaasiline peptiidsüntees (SPPS)

Meetodit peptiidide sünteesimiseks ahela järk-järgulisel pikendamisel aminohappejääkidega on kasutatud alates 1905. aastast [24-27]. Peamiselt kasutatakse selleks kahte viisi, peptiidsüntees lahuses või peptiidsüntees tahkel kandjal. Mõlema lähenemise põhimõte on sama [25]: ahela pikenemine toimub aminohapete vaheliste sidumisreaktsioonide ning ahelasse lisatud aminohappejäägi ajutise kaitserühma eemaldamise kaudu [24]. Peamine erinevus meetodite vahel seisneb ahela esimese aminohappe karboksüülrühma kaitserühma ehk püsiva kaitserühma lahustuvuses reaktsioonikeskkonnas. Kui kaitserühm on lahustuv, siis on meetodiks peptiidsüntees lahuses. Kui selleks on aga lahustumatu vaik ehk tahke kandja, siis on tegemist tahkefaasilise peptiidsünteesiga [25].

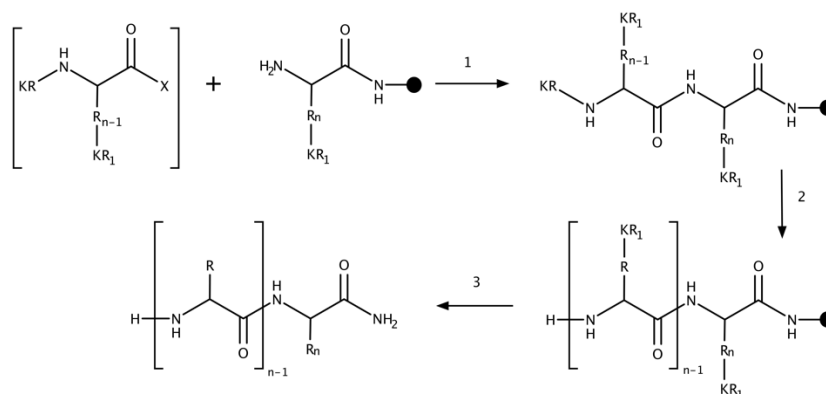
Lahusefaasilise peptiidsünteesi korral järgneb igale sidumisreaktsioonile saadud ahela eraldamine, puhastamine ja määramine. Alles peale neid protseduure eemaldatakse kaitserühm ning järgmine aminohape lisatakse järjestusse [25]. Seetõttu on lahusefaasilise peptiidsünteesi meetod aeganõudev ning lisaks muutuvad aminohappejääkide arvu kasvuga ahelas probleemsemaks nii polüpeptiidi lahustuvus kui ka puhastamine [25,28]. Mõningaid nimetatud probleemidest on aidanud vältida ja peptiidsünteesi protsessi lihtsustada tahkefaasilise peptiidsünteesi meetodi kasutuselevõtt [25,28,29].

Tahkefaasiline peptiidsüntees arendati välja 1963. aastal ning esimeseks selle meetodiga sünteesitud peptiidiks oli klorometüleeritud nitropolüstireenvaigule kinnitatud tetrapeptiid Leu-Ala-Gly-Val [28]. Tahkefaasilise peptiidsünteesi idee seisneb end lahusefaasilise peptiidsünteesi kasutusel tõestanud meetodite säilitamisel ja kohaldamisel olukorrale, kus järjestuse esimene *N*-kaitstud aminohape on *C*-terminaalse otsa kaudu kovalentselt seotud kasutatavas solvendis lahustumatu polümeerse kandjaga [24,25,28,30]. Seejärel eemaldatakse

ahelas oleva aminohappe *N*-terminaalne kaitserühm ning lisatakse järjestusse järgmine *N*-kaitstud aminohape (**Skeem 3**) [29,30]. Seega toimub ahela pikendamine C → N suunas [24,25,30]. Peptiide on võimalik sünteesida ka vastupidises suunas, kuid see on vähem levinud meetod aminohappe aktivatsiooni tekkiva oksasooloni vaheühendi tõttu, mis põhjustab ratsemisatsiooni [25,29].

Aminohapete vahelised sidumisreaktsioonid toimuvad tavaliselt maksimaalse sünteesisaagise saavutamiseks reagentide suures liias, mida on võimalik tänu tahkele kandjale ankurdatud peptiidile lihtsasti välja filtreerida [24,28,30]. Seega toimub sidumisprotsesside vahel peptiidi puhastamine kasutatavas solvendis lahustuvate kõrvalproduktide ja reagentide jääkide väljapesemise teel [28]. Lisaks on võimalik kõik sünteesietapid läbi viia samas reaktsioonianumas, mis elimineerib võimaluse peptiidi üleviimisel tekkivateks kadudeks [30].

Kaitserühma eemaldamise ning uue aminohappe sidumise etappe korratakse kuni soovitud aminohappelise järjestusega peptiid on moodustunud [24,25,29,30]. Sünteesiprotsessi viimaseks etapiks on peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt [24,29,30].



Skeem 3. Tahkefaasilise peptiidsünteesi üldine sünteesiskeem, kus ● on tahke kandja, R aminohappe kõrvalahel, KR *N*-terminaalse otsa kaitserühm, KR₁ aminohappe kõrvalahela kaitserühm ning X lahkuv rühm. 1) Tahkel kandjal asuva järjestuse reaktsioon lisatava aktiveeritud aminohappega; 2) *N*-terminaalse kaitserühma eemaldamine ning ahela pikendamine soovitud aminohappelise järjestuseni; 3) Aminohapete kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamine ning peptiidi vabastamine tahkelt kandjalt.

2.2.1 Kaitserühmad

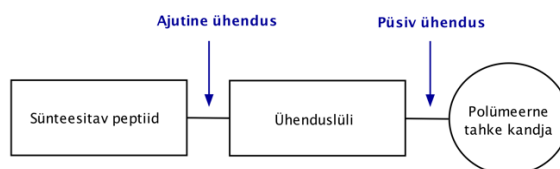
Tahkefaasilise peptiidsünteesi käigus aset leidvad korduvad sidumis- ja kaitserühma eemaldamise protsessid peavad vältima peptiidi enneaegset eemaldumist kandjalt ning ebasoovitavaid muudatusi järjestuses [29]. Samuti peavad tahkelt kandjalt eemaldamise tingimused tagama lõpp-produkti terviklikkuse [31]. Seega on eduka tahkefaasilise peptiidsünteesi tagamiseks oluline tahke kandja, selle ühenduslüli peptiidiga ja peptiidjärjestuses olevate aminohapete kaitserühmade õige valik [24].

2.2.1.1 C-terminaalsed kaitserühmad

Tahke kandja valik on oluline, et tagada sünteesi kulgemine edukalt ning probleemideta [24]. Kuna suurem osa (ligikaudu 99%) kinnituskohtadest asub vaiguosakeste sees ning peptiidsüntees toimub tahke kandja pundunud polümeeri võrgustikus, peab see vastama mitmetele kriteeriumitele: olema sünteesi käigus kasutatavates solventides mittelahustuv, omama piisavat füüsilist stabiilsust filtreerimiseks ning omama sobivat funktsionaalset rühma, kuhu järjestuse esimene aminohape saaks kovalentselt seonduda [25,28,30]. Lisaks on oluline tahke kandja pundumisvõime: vaik, mis omab häid pundumisomadusi, annab eelduse suurematele reagentide difusioonikiirustele polümeeri maatriksisse, kus asuvad järjestuse esimesele aminohappele potentsiaalseteks reaktsioonisaitideks olevad ühenduslülid, ning tagab sidumisreaktsioonide toimumise kiiresti ja hea saagisega [24,30,32].

Tahkefaasilises peptiidsünteesis kasutatakse palju ristseotud polüstüreenil põhinevaid vaikusid (PS) [30], aga ka polüetüleenglükoolil (PEG), polüetüleenglükool-polüstüreenil (PEG-PS), polüamiidil (PA), polüetüleenglükoolakrüülamiidi (PEGA) kopolümeeridel ja polüetüleen-polüstüreenil (PE-PS) põhinevaid vaike. Ristseotud polüstüreenid on lahustumatud kõigis levinumates solventides, kuid solvateeruvad ja punduvad aprotoonsetes solventides nagu DCM, DMF ja THF [25]. Sellise tahke kandja osakeste puhul tagab kõige optimaalsed tingimused pundumiseks DCM, sidumisreaktsioonide korral on eelistatud aga näiteks DMF ja NMP, et tagada kasutatavate reaktiivide parem lahustuvus reaktsioonikeskkonnas [30]. TMR katsed on näidanud, et sobivate solvatatsioonitingimuste korral on näiteks 1–2% divinüülbenseen-ristseotud PS tahke kandja lineaarsed polüstüreenahelad reagentidele sama ligipääsetavad kui vabas lahuses [24].

Tahkefaasilisel peptiidsünteesil kasutatav vaak koosneb lisaks polümeersele tahkele kandjale ka sellega püsivalt seotud ühenduslülis, mis võimaldaks esimese aminohappe kinnitumist vaigule ajutiselt (**Skeem 4**) [25]. Hea vahelüli omadusteks on järjestuse esimese aminohappe sidumine tahkele kandjale suure saagisega, stabiilsus sünteesi käigus kasutatavate solventide ja kemikaalide suhtes ning järjestuse tahkelt kandjalt eemaldamise tingimused, mis on efektiivsed, ei kahjusta peptiidi ega tekita raskesti eemaldatavaid kõrvalprodukte [31].



Skeem 4. Peptiidi kinnitumine tahkele kandjale ühenduslüli kaudu.

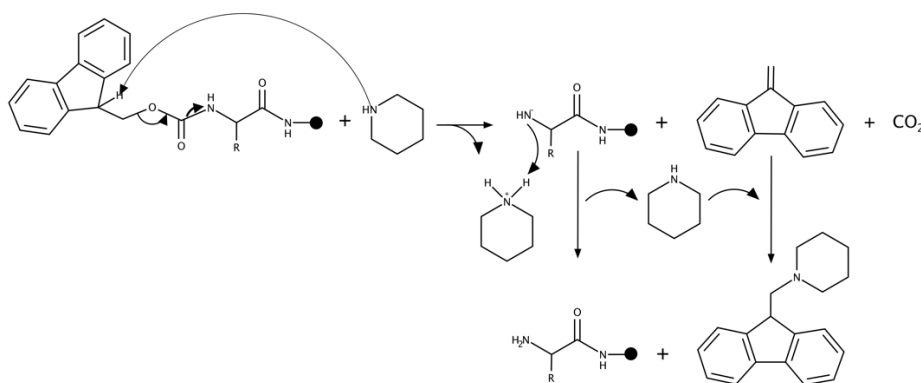
Ühenduslülide kasutamine võimaldab peptiidi *C*-terminaalse otsa funktsioneerimist [24]. Kõige levinum on järjestuse esimese aminohappe sidumine tahkele kandjale amiid- või estersideme kaudu, saades lõpp-produktina peptiidi, mis on vastavalt *C*-terminaalne amiid või *C*-terminaalne karboksüülhape [24,30]. Amiidvaike kasutatakse laialdaselt nende ühilduvuse tõttu Fmoc-kaitserühma strateegiaga [30]. Peptiidi tahkelt kandjalt eemaldamiseks kasutatakse sellisel juhul peamiselt mõnda tugevat hapet, näiteks trifluoroetaanhapet (TFA) [30,33].

2.2.1.2 *N*-terminaalsed kaitserühmad

Soovimatute peptiidsidemete ning kõrvalreaktsioonide vältimiseks kasutatakse peptiidide sünteesimisel kaitserühmi [34]. Lisatavate aminohapete α -aminorühmad on kaitstud ajutise kaitserühmaga, mis eemaldatakse peale iga sidumisreaktsiooni. Aminohapete kõrvalahelate funktsionaalrühmad on aga maskeeritud püsivate kaitserühmadega, mis on sidumisreaktsioonide tingimuste suhtes stabiilsed ning eemaldatakse alles siis, kui sünteesiprotsess on lõpule jõudnud [25,30]. Aminohappeid saab kõrvalahela kaitserühma vajaduse alusel jagada kolmeks: aminohapped, mille kõrvalahel ei vaja kaitsmist, kõrvalahela kaitsmine on soovituslik ning kõrvalahela kaitsmine on vajalik. Kõrvalahelate kaitserühmade valikul on oluline ortogonaalsus kasutatava ajutise kaitserühmaga ning võimalikkus eemaldada neid samaaegselt peptiidi vabastamisega tahkelt kandjalt [25].

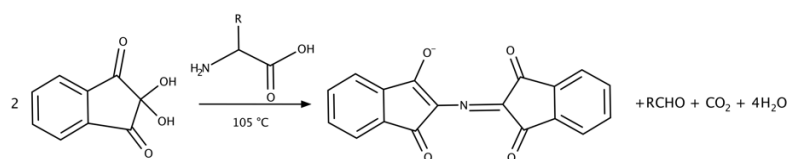
Tahkefaasilisel peptiidsünteesil kasutatakse peamiselt kahte lähenemist: *tert*-butüülkarbonüül (Boc)/bensüül (Bzl) strateegia ja 9-fluorenüülmetoksükarbonüül (Fmoc)/*tert*-butüül (*t*-Bu)

strateegia [25,30,34-36]. Boc/Bzl lähenemise korral on ajutiseks ehk α -aminorühma kaitserühmaks Boc ning kõrvalahelate kaitserühmaks Bzl [25] ja see põhineb ortogonaalsete kaitserühmade erineval happelabiilsusel. Boc/Bzl strateegia korral esineb mitmeid probleeme, mistõttu on tänapäeval Fmoc/*t*-Bu meetod peamiseks kaitserühmade strateegiaks nii tööstuslikult kui ka teadusarenduses [25,30]. Selle lähenemise korral on α -aminorühma kaitserühmaks Fmoc, mis on ortogonaalne paljude kaitserühmade suhtes, ning mille eemaldamiseks on vajalik mõõdukalt aluseline keskkond. Tarvilike tingimuste loomiseks kasutatakse peamiselt piperidiini, mis viib vaba aminorühmaga ühendi tekkeni ning muuhulgas tekib dibensofulveeni ja piperidiini vahelise reaktsiooni käigus fulveen-piperidiin vaheühend (**Skeem 5**) [25].



Skeem 5. Fmoc-kaitserühma eemaldamine piperidiiniga ning fulveen-piperidiin vaheühendi teke, kus • tähistab tahket kandjat ning R aminohappe kõrvalahelat.

Kuna tekkev kõrvalprodukt neelab UV-kiirgust, on aluskatalüütiliselt Fmoc-kaitserühma eemaldamise protsessi edukust võimalik jälgida TLC-testi abil, mis võimaldab hinnata ka Fmoc-kaitstavate funktsionaalrühmade kogust [30,37]. Peamiselt jälgitakse Fmoc-kaitserühma eemaldamise ning sidumisreaktsiooni efektiivsust aga Kaiser'i ehk ninhüdrini testiga. Ninhüdrin reageerib vabade *N*-terminaalsete rühmadega, mille tulemusena värvub lahus kõrgel temperatuuril tumesiniseks (positiivne test). Vabade aminorühmade puudumisel säilitab lahus kollase värvuse (negatiivne test) ning sidumisreaktsioon on olnud edukas (**Skeem 6**) [38].



Skeem 6. Ninhüdrini seondumine aminohappe vaba *N*-terminaalse rühmaga.

Kõrvalahelate kaitserühmad ning peptiidi tahke kandjaga siduv ühenduslüli on erinevalt Fmoc kaitserühmast happelabiilsed ning nende samaaegselt eemaldamiseks ja peptiidi tahkelt kandjalt lõikamiseks kasutatakse kontsentreeritud TFA-d. Kuna ajutised ja püsivad kaitserühmad eemaldatakse Fmoc/*t*-Bu lähenemise korral erinevatel reaktsioonitingimustel, on nii *N*- kui *C*-terminaalsete kui ka kõrvalahelate kaitserühmade elimineerimiseks võimalik kasutada leebemaid tingimusi kui Boc/Bzl strateegia korral. Seetõttu sobib Fmoc/*t*-Bu lähenemine ka happekatalüütilistele kõrvalreaktsioonidele tundlike peptiidide sünteesimiseks ning on kujunenud rutiinsel tahkefaasilisel peptiidsünteesil peamiselt kasutatavaks kaitserühmade strateegiaks [24,25,30].

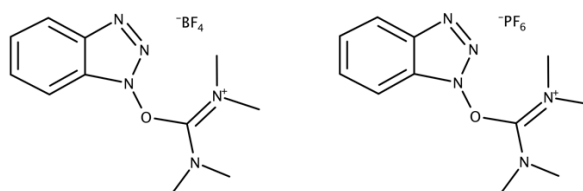
2.2.2 Aktivaatorid

Peptiidsünteesi tuumikreaktsiooniks on amiid- ehk peptiidsideme moodustumine aminohapete karboksüül- ja aminorühma vahel [24,25,39,40]. Nende kahe funktsionaalrühma omavaheline ühinemine ei toimu toatemperatuuril spontaanselt: sideme moodustamiseks vajalik vee elimineerumine leiab aset alles kõrgetel temperatuuridel, sellised tingimused võivad aga kahjustada substraatide terviklikkust [39]. Toatemperatuuril toimub amiidsideme moodustumise asemel hoopis alus-hape reaktsioon, mille produktiks on ammooniumsool [25]. Selle vältimiseks lisatakse reaktsioonisegusse täiendav reagent ehk aktivaator, mis muudab läbi karboksüülrühma aktiveerimise vastava OH-rühma paremaks lahkuvaks rühmaks aminorühma nukleofiilse rünnaku eelselt [25,30,39]. Võimalik on ka aktiveeritud vaheoleku reaktsioon mõne teise nukleofiiliga, mis pärineb reagentidest või lisatakse reaktsioonisegusse eesmärgiga moodustada stabiilsem vaheolek, näiteks aktiivester või sümmeetriline anhüdriid, mis seejärel reageerib peptiidsideme moodustamiseks aminorühmaga [41]. Mõlemal juhul hõlmab sidumisreaktsioon peptiidsünteesis *C*-kaitstud aminohappejäägi aminorühma nukleofiilset rünnakut *N*-kaitstud aminohappejäägi aktiveeritud karboksüterminusele [24,40-42]. Reaktsiooni efektiivseks läbiviimiseks rakendatakse tahkefaasiliste meetodite korral suurt aktiveeritud aminohappe ja teiste reagentide ülehulka [30,42].

Etapiviisiliseks aminohapete lisamiseks peptiidjärjestusse kasutatakse mitmesuguseid aktivaatoreid [25]. Aminohappe karboksüülrühma on võimalik aktiveerida muutes selle näiteks atsüülhaliidiks, atsüülasiidiks, atsüülimidiasooliks, anhüdriidiks või estriks [29]. Peamiselt kasutatakse peptiidsünteesi aktivaatoritena aga karbodiimiide ja fosfooniumi või amiiniumi sooli [25,42]. Kuigi karbodiimiidid on peptiidsünteesis tähtsal kohal, kasutatakse viimastel

aastatel aktivaatoritena pigem amiinium- ja fosfoonium-tüüpi reagente, mis võimaldavad kiiremaid sidumisreaktsioone väheste kõrvalproduktide tekkega [24,40].

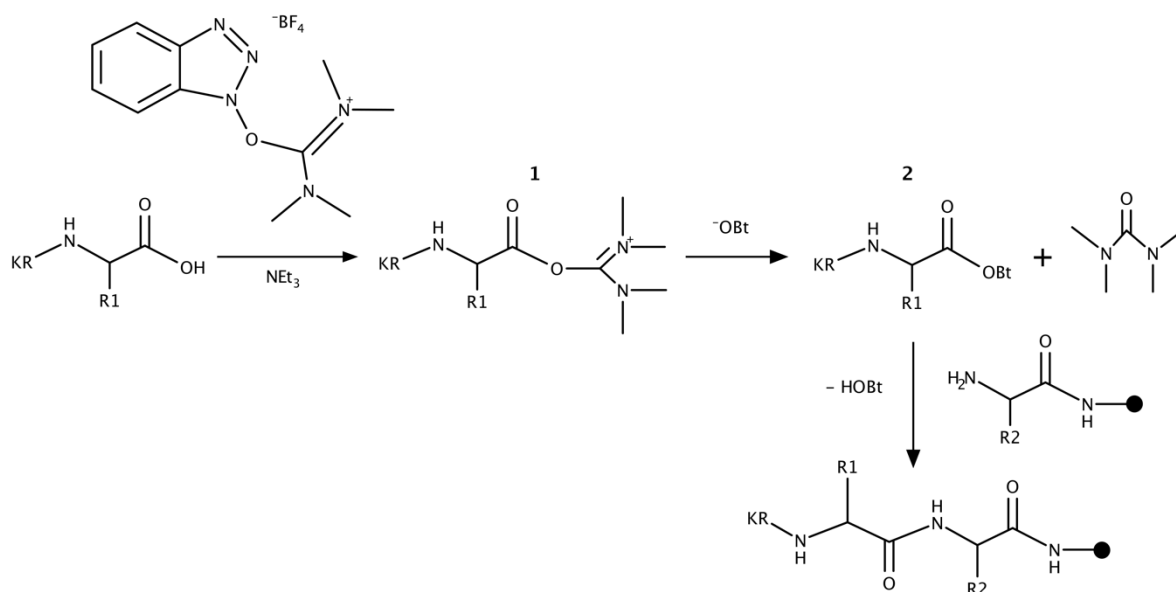
Amiiniumpõhised aktivaatorid, näiteks TBTU ja HBTU (**Skeem 7**), sisaldavad positiivset süsiniku aatomit ning muudavad *N*-kaitstud aminohapped vastavateks bensotriasoolestriteks [25,30]. Need ühendid, mis erinevad üksteisest ainult oma mittenukleofiilse vastasiooni poolest, on keemilistelt omadustelt praktiliselt identsed ning omavad laiaulatuslikku kasutust tahkefaasilises peptiidsünteesis, kuna kõik tekkivad kõrvalproduktid on lahustuvad nii vees kui ka standardsetes orgaanilistes lahustites [40,43].



Skeem 7. Peptiidsünteesi aktivaatorite TBTU (vasakul) ja HBTU (paremal) struktuurid.

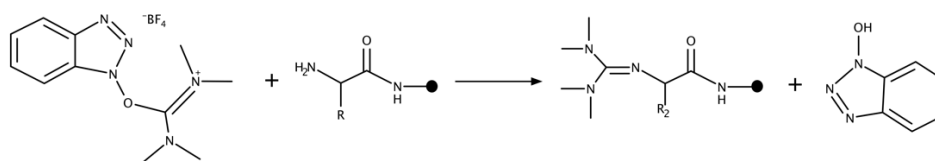
Vastupidiselt aktivatsioonile karbodiimiididega, vajavad amiiniumi ja fosfooniumi põhised aktivaatorid aluselist keskkonda [40], et moodustada *N*-kaitstud aminohappest karboksülaatioon, mis on võimeline reageerima aktivaatoriga [30,41,44]. Selleks kasutatakse tavaliselt tertsiarseid amiine, näiteks diisopropüülamiini (DIPEA), kuna neil puuduvad nukleofiilsed omadused [43].

Peptiidsideme tekkimiseks reageerib deprotoneeritud karboksüülrühm esmalt amiiniumpõhise aktivaatoriga, milleks on näiteks TBTU, ning moodustuvad aktiveeritud vaheühend (**Skeem 8, 1**) ja anioon (^-OBt), mis reageerib kiirelt aktiveeritud ühendiga ja moodustab reaktiivse bensotriasoolistri (**Skeem 8, 2**), millega toimub aminolüüs [29]. Sellised aromaatsed aktiivestrid omavad head vastuvõtlikkust nukleofiilse rünnaku suhtes, kuna lahkuva rühma (^-OBt) elektronaktseptoorsed omadused suurendavad karbonüülse süsiniku elektrofiilsust [25,29,41]. Lisaks kiirendab täiendava koguse HOBt-i lisamine lahusesse sidumisreaktsiooni ning vähendab ratsemisatsiooni [41,43].



Skeem 8. Peptiidside teke aktivaatoriga TBTU, kus • märgib tahket kandjat, KR *N*-terminaalse otsa kaitserühma, R aminohappe kõrvalahelat ning NEt_3 trietüülamiini.

Amiiniumi sooladel on võime pöördumatult reageerida tahke kandjaga seotud järjestuse aminorühmaga, mis tingib blokeeritud ehk *N*-terminaalse guanidiinrühmaga peptiidide teke (**Skeem 9**) [25,29,30,41]. Seetõttu viiakse esmalt läbi eelreaktsioon aminohappe karboksüülrühma aktiveerimiseks amiiniumi soolaga ning alles seejärel lisatakse reaktsioonisegusse vaba aminorühm, mis reageerib aktiveeritud aminohappega, et moodustada peptiidside [25].

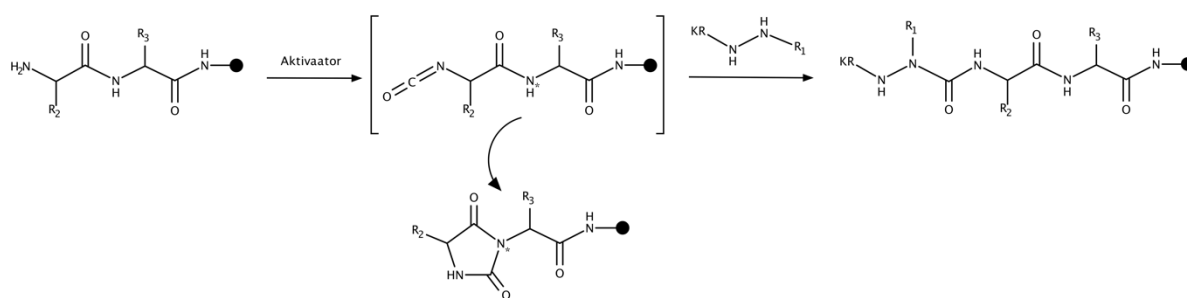


Skeem 9. *N*-terminaalse guanidiinrühmaga peptiidi teke aktivaatoriga TBTU, kus • on tahke kandja.

2.3 Tahkefaasiline asa-peptiidsüntees

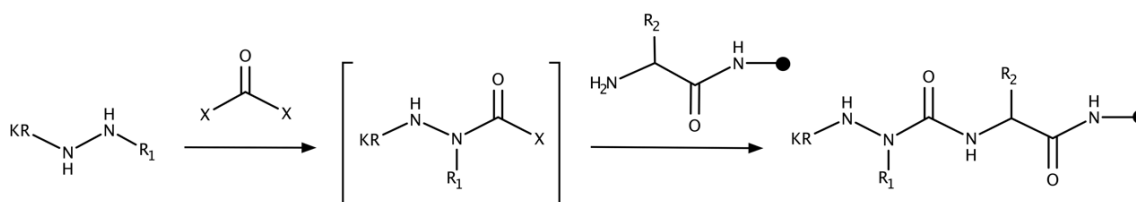
Hoolimata asa-peptiidide headest omadustest peptidomimeetikutena, on neid pigem vähe uuritud [5,6]. Selle põhjuseks on rutiinsest peptiidsünteesist komplitseeritum süntees: aasaminohapete järjestusse viimiseks on vaja vastavaid prekursoreid, mille keemiline valmistamine on keerukas ja ka lisamine peptiidjärjestusse raskendatud, seoses aasaminohappejäägi *N*-terminaalse otsa vähenenud reaktiivsusega võrreldes naturaalse aminohappejäägiga [5-7,45,46]. Kuna asa-peptiidide sünteesimiseks vajalike aasaminohapete prekursoritena kasutatakse asendatud hüdrasiine, siis peetakse asa-peptiidsünteesi kombinatsiooniks hüdrasiini- ja peptiidikeemiast [15,18,47-50].

Tahkefaasiliseks asa-peptiidide sünteesiks kasutatakse peamiselt kahte meetodit. Esimene neist hõlmab tahke kandjaga seotud peptiidi *N*-terminaalse aminorühma aktiveerimist isotsüanaadiks või aktiivestriks, millele järgneb reaktsioon asendatud monokaitstud hüdrasiiniga (**Skeem 10**) [9,18,48,51,52]. Selle lähenemise puuduseks on aga hüdantoiini moodustumine kõrvalproduktina, mis on põhjustatud intramolekulaarsest (aktiveeritud aminohappele eelneva aminohappe peaahela lämmastiku) nukleofiilsest rünnakust aktiveeritud *N*-terminaalsele otsale [9,15,18,48,49,51]. Eelnevalt mainitud kõrvalreaktsiooni kulgemise tagajärjedeks on vähenenud sidumisreaktsiooni kiirus, madalad sünteesisaagised ning keerukas puhastusprotsess [1,9,53]. Hüdantoiini tekke vältimiseks on võimalik blokeerida sekundaarne lämmastik (**Skeem 10**, N*) *N*-2-hüdroksü-4-metoksübensüül (Hmb) kaitserühmaga, mis vajab aga kahte täiendavat sünteesietappi [9,18,49].



Skeem 10. Aas-peptiidi süntees tahke kandjaga seotud peptiidi *N*-terminaalse otsa aktiveerimisel isotsüanaadina ning hüdantoiini kõrvalprodukti teke. • tähistab tahket kandjat, KR *N*-terminaalset kaitserühma, R aminohappe kõrvalahelat ning N* sekundaarset lämmastikku, mis initsieerib hüdantoiini kõrvalprodukti moodustumise.

Teise lähenemise korral aktiveeritakse järjestusse lisatava asa-aminohappe hüdrasiinne prekursor, mis seejärel seotakse tahke kandjaga seotud peptiidi *N*-terminaalsele rühmale (**Skeem 11**) [7,9,18]. Selle meetodi eeliseks on võimalus kasutada aktiveeritud asa-aminohappe prekursorit *C*-terminaalselt kaitstud sünteesitava järjestuse suhtes ülehulgas, et tagada sidumisreaktsiooni täielikkus [15,51]. Kuigi asendatud hüdrasiinide valmistamine vajab mitmeid eelnevaid etappe, on selle sünteesiraja valimisel võimalik vältida hüdantoiini vaheühendi teket [9,18].

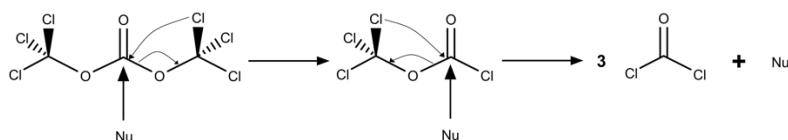


Skeem 11. Asa-aminohappe prekursori aktivatsioon ning reageerimine tahke kandjaga seotud peptiidi *N*-terminaalse otsaga. • märgib tahket kandjat, KR *N*-terminaalse otsa kaitserühma, R aminohappe kõrvalahelat ning X lahkuvat rühma.

Seega moodustatakse asa-peptiide asendatud hüdrasiinidest peamiselt kas reaktsioonil karbonüülrühma doonoriga, millele järgneb aminohappe sidumisreaktsioon, või otsesel reaktsioonil isotsüanaadiks muudetud peptiidiahelaga [1]. Aktivaatorid, mida on kasutatud asa-peptiidsünteesil karbonüülrühma doonoritena asa-aminohappe prekursori aktiveerimiseks, on näiteks *p*-nitrofenüülkloroformaat [20,47], karbonüüldiimidiasool (CDI) [48], bis(2,4-nitrofenüül)karbonaat [52], bis(pentafluorofenüül)karbonaat [54] ning fosgeen [9,19,51] ja bis(triklorometüül)karbonaat (BTC) ehk trifosgeen [53,55,56]. Aktiveeritud nitrofenüülkarbasaadid ja imidasoolid on pigem madala reaktiivsusega ning vajavad peptiidsideme tekkeks pikki reaktsiooniaegu ja kõrgemaid temperatuure. Samas on sünteesisaagis siiski madal ning tekib hulgaliselt kõrvalprodukte [9,15,48]. Asendatud hüdrasiine on aga edukalt õnnestunud aktiveerida reaktiivseteks asa-aminohapete klooranhüdriidideks, mis reageerivad järgnevalt *C*-terminaalselt kaitstud peptiidi aminotermiinaalse otsaga ilma eraldamatute kõrvalproduktide tekketa, kasutades aktivaatoritena fosgeeni ja trifosgeeni [9,10,18,51,53,55-57]. Kuigi selle lähenemise korral on kasutatud küllalt pikki reaktsiooniaegu ning sidumisreaktsiooni kordamist, on siiani tegemist kõige efektiivsema meetodiga asa-aminohappe lisamiseks peptiidjärjestusse [9,10,57].

Trifosgeen on fosgeeni tahke analoog, mida kasutatakse paljude orgaaniliste ühendite sünteesimiseks, kuna võimaldab häid sünteesisaagiseid mõõdukatel reaktsioonitingimustel

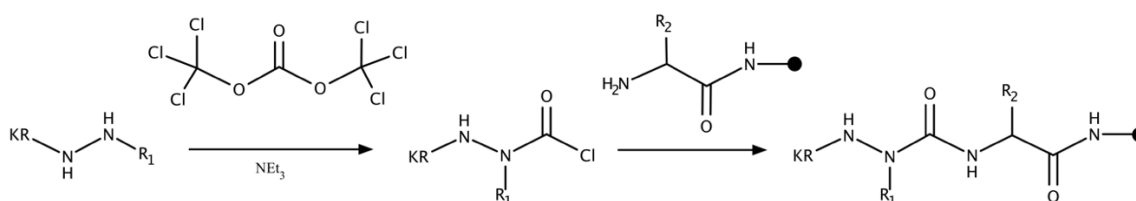
[56,58,59]. Võrreldes fosgeeniga, on trifosgeeni lihtsam transportida, hoiustada ja käsitleda, aga ka täpselt kaaluda [58-61]. Samas on trifosgeenis säilunud fosgeeni kõrge reaktiivsus, kuna BTC kaks triklorometoksurühma on elektroonselt peaaegu ekvivalentsed klooriaatomitele fosgeenis [56,59]. Trifosgeen laguneb nii kuumutamisel kui ka mistahes nukleofiiliga reageerimisel kolmeks fosgeeni molekuliks, mistõttu 1 mool BTC-d reageerib kui 3 mooli fosgeeni (**Skeem 12**) [59,60,62].



Skeem 12. Trifosgeeni lagunemine fosgeeniks nukleofiili initsieerimisel.

Trifosgeeni kasutatakse efektiivse aktivaatorina karbonüülrühma lisamiseks as-aminohappejääki nii tahke- kui ka lahusefaasilisel as-peptiidide sünteesil [15,48,53,56]. Asendatud hüdrasiin aktiveeritakse *in situ* vastavaks as-aminohappe klooranhüdriidiks, mida pole võimalik isoleerida [18,51,56,63]. BTC lagunemise tõttu fosgeeniks, on selle üleliiga võimalik aktivatsioonijärgselt lahusest alandatud rõhul hõlpsalt eemaldada [7,18,51]. Kuna trifosgeen on oma kõrge reaktiivsuse tõttu võimeline reageerima orgaaniliste solventide nagu DMF ja NMP amiidrühmaga, viiakse hüdrasiini aktiveerimine läbi inertses solvendis, milleks on tavaliselt DCM [7].

Aktiveeritud as-aminohappejäägi edasisel reageerimisel tahke kandjaga seotud peptiidi aminorühmaga moodustub as-peptiid (**Skeem 13**), mis leiab samuti aset kuivas inertses solvendis [18,29,41,48,56,63]. Selle reaktsiooni läbiviimiseks on vajalik aluse, milleks on tavaliselt mittenukleofiilne tertsiarne amiin, juuresolek. Seda kasutatakse tekkinud HCl elimineerimiseks ning ka selleks, et vältida aminorühma muundumist mittereaktiivseks HCl soolaks [29,41].



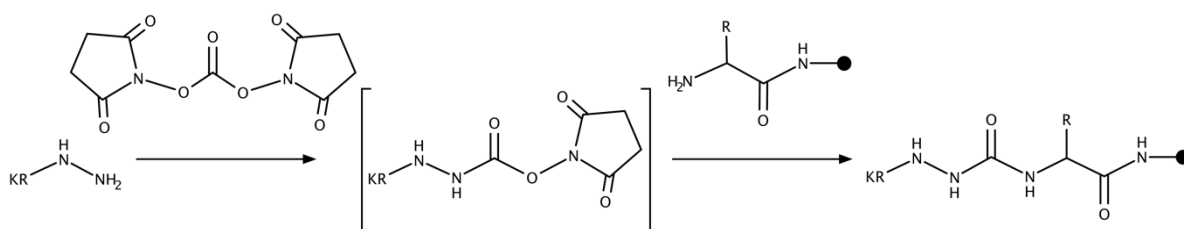
Skeem 13. As-aminohappesäde aktiveerimine trifosgeeniga ning as-peptiidi moodustumine, kus • on tahke kandja, KR on *N*-terminaalse otsa kaitserühm, R aminohappe kõrvalahel ning NEt_3 trietüülamiin.

2.3.1 Asa-glütsiini peptiidjärjestusse lisamine

Glütsiin on unikaalne aminohape, mille α -süsinikul on erinevalt teistest aminohapetest kõrvalahela asemel vaid vesinik [64]. Asa-glütsiini sidumine peptiidjärjestusele on olnud pigem väljakutset pakkuv, tekitades komplikatsioone nii madalate sünteesisaagiste kui ka kõrvalreaktsioonide näol [46,65].

Mitmetes uurimustes on asa-glütsiini jäagi lisamiseks peptiidjärjestusse kasutatud samasugust eeskirja nagu teistegi asa-aminohappe jääkide korral: monokaitstud hüdrasiin aktiveeritakse fosgeeni või sellele ekvivalentse ühendiga, misjärel toimub sidumisreaktsioon aktiveeritud ühendi ja vaba aminorühma vahel [9,18,66]. Siiski on avastatud, et eelnevalt kirjeldatud meetod ei ole asa-glütsiini järjestusse lisamiseks kõige efektiivsem, kuna monokaitstud hüdrasiini aktiveerimisel fosgeeni või selle analoogidega moodustub kõrvalproduktina tsükliline oksadiasoloon, mis ei pruugi alati viia soovitud asa-glütsiinterminaalise peptiidi moodustumiseni [10,51,57,65,66]. Lisaks on fosgeeni ja selle ekvivalentide kasutamisel asa-glütsiini prekursori aktiveerimiseks täheldatud ennatlikku Fmoc-kaitserühma eemaldumist sellelt, mis viib samuti kõrvalreaktsioonide kulgemiseni. Enneaegse Fmoc-kaitserühma kõrvaldumiseni võib mõningate uurimuste kohaselt viia ka aluse, milleks on üldjuhul DIPEA, juuresolek [46].

Hiljuti on asa-glütsiini sisaldavate peptiidide sünteesiks hakatud tihemini aktivaatorina kasutama N,N' -disuktsiinimidüülkarbonaati (DSC), mis on võimaldanud saada häid sünteesisaagiseid [10,57,66-68]. Monokaitstud hüdrasiini reaktsioonil DSC-ga moodustub piisavalt stabiilne aktiveeritud suktsiinimidüülester, mis on hea reaktiivsusega sidumisreaktsioonil tahkele kandjale seotud peptiidi aminorühmaga ning väldib oksadiasolooni kõrvalprodukti moodustumist (**Skeem 14**) [29,67,68].



Skeem 14. Asa-glütsiini lisamine peptiidjärjestusse aktivaatoriga DSC, • tähistab tahket kandjat, KR *N*-terminaalset kaitserühma ning R aminohappe kõrvalahelat.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Reaktiivid, töövahendid ja aparatuur

Töös kasutatud reaktiivid

<u>Aine</u>	<u>Molaarmass [g/mol]</u>	<u>Puhtus [%]</u>	<u>Tootja</u>
ACN	41,05	≥ 99,8	Sigma-Aldrich
BTC	296,75	-	Merck
DCM	84,39	≥ 99,9	Sigma-Aldrich
DIPEA	129,25	≥ 98,0	Sigma-Aldrich
DMF	73,09	≥ 99,8	Sigma-Aldrich
DSC	256,16	98	ACROS Organics
Et ₂ O	74,12	99,9	Lach-Ner
Fmoc-L-Ala-OH*H ₂ O	311,32*18,01	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Phe-OH	387,40	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Val-OH	339,39	-	Iris Biotech
Fmoc-NH-NH ₂	254,30	Kontrollitud TLC testi ja TMR-iga	Sünteesitud A. Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-NH-NH-CH ₃	268,33	Kontrollitud TLC testi ja TMR-iga	Sünteesitud A. Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-NH-NH-CH(CH ₃) ₂	310,42	Kontrollitud TLC testi ja TMR-iga	Sünteesitud A. Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-NH-NH-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	296,39	Kontrollitud TLC testi ja TMR-iga	Sünteesitud A. Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-Rink-Amiid MBHA vaik	-	-	Iris Biotech
HOBt	135,12	≥ 97,0	Sigma-Aldrich
Piperidiin	85,15	99	Sigma-Aldrich
TBTU	234,38*86,81	-	Iris Biotech
TiS	158,36	99	Sigma-Aldrich
TFA	114,02	99	Sigma-Aldrich

Töövahendid ja aparatuur

Proovide analüüsimiseks kasutati massi- ja UV-Vis detektoritega HPLC instrumenti (Shimadzu LCMS-2020, SPD-M20A), mis on varustatud Kinetex 5 μ M EVO kolonniga (C18, 100 Å, 250 x 4,6 mm). Proovid sisestati manuaalselt, voolutati gradientprogrammi kasutades ning analüüsiti lainepikkusel 220 nm. Andmete analüüsimiseks kasutati programmi LabSolutions Version 5.82 SP1 ning arvutuste teostamiseks programmi GraphPad 5 Version 5.04.

3.2 Sünteeside kirjeldused

3.2.1 Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Val-Phe-NH-vaik sünteesid

Dipeptiidide järjestused sünteesiti tuginedes üldisele tahkefaasilise peptiidsünteesi eeskirjale (**reaktsiooniskeemid Lisa 1 ja 2, etapid 1–2**) [69].

Fmoc-Rink-Amiid MBHA vaigul (0,68 mmol/g, 0,34 mmol) lasti filtriga varustatud 20 ml reaktsioonikolonnis DCM-is punduda, misjärel eemaldati sellelt Fmoc-kaitserühm, kasutades 20% piperidiini lahust DMF-is (2 + 20 min). Protseduuri järgselt pesti tahket kandjat 5 x DMF ning 1 x DCM-ga. *N*-terminaalse kaitserühma eemaldumine kinnitati Kaiseri testiga (KT). Fmoc-L-Phe-OH (1,02 mmol, 3 ekv) kaaluti tsentrifuugituubi ning lahustati minimaalses koguses DMF-is. Aktivaatorid TBTU ja HOBt (1,02 mmol, 3 ekv), mis lahustati DMF-is, ning DIPEA (2,04 mmol, 6 ekv) lisati aminohappele ja eelaktivatsioonil lasti toimuda 2 minuti jooksul, misjärel lisati segu reaktsioonikolonnis olevale tahkele kandjale. Sidumisreaktsioonil lasti toimuda ligikaudu 1 h. Seejärel pesti tahket kandjat 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF solventidega ning kontrolliti KT abil, et puuduksid vabad aminorühmad. Peale lisatud aminohappelt Fmoc-kaitserühma eemaldamist, lisati järjestusele järgmine aminohape (Fmoc-L-Ala-OH·H₂O või Fmoc-L-Val-OH), kasutades eelnevalt kirjeldatud eeskirja.

3.2.2 Kineetilised mõõtmised mudel asa-peptiidi H-asaAH-Ala-Phe-NH-vaik sünteesil

3.2.2.1 Fmoc-asaAH prekursori aktivatsioon BTC-ga

Asa-aminohapete Fmoc-kaitstud prekursorid aktiveeriti vastavalt meie uurimisgrupis kasutatavale tahkefaasilise asa-peptiidsünteesi eeskirjale, mida kohandati ühildumaks meie uurimisgrupis välja töötatud kineetiliste mõõtmiste meetodikaga (**reaktsiooniskeem Lisa 1, etapp 3.1, A**) [5,6].

Lämmastikuga rikastatud reaktsioonikolbi kaaluti järjestusse lisatava asa-aminohappe (asaAla, asaVal, asaLeu) Fmoc-monokaitstud prekursor (0,41 mmol, 10 ekv), mis lahustati 3,5 ml-s kuivas DCM-is. Kolbi lisati DIPEA (0,82 mmol, 20 ekv), misjärel jahutati reaktsioonisegu temperatuurile 0 °C. Aktivaator BTC (0,13 mmol, 3,3 ekv) lahustati 0,5 ml-s kuivas DCM-is ning lisati segusse tilkhaaval läbi süstla. Aktivatsiooniprotsessil lasti lämmastiku atmosfääris temperatuuril 0 °C toimuda 30 minutit, misjärel segu termostateeriti 25 °C-ni.

Paralleelselt kaaluti reaktsioonikoloni tahkele kandjale kinnitatud Fmoc-kaitstud dipeptiid (60 mg, 0,04 mmol), mille sünteesieeskirja kirjeldati peatükis 3.2.1. DCM-is pundunud peptiidilt eemaldati Fmoc-kaitserühm. Seejärel kanti dipeptiid 6 ml kuiva DCM-iga üle 50 ml tsentrifuugituubi, termostateeriti 25 °C juures ning sellele lisati reaktsioonikolvist aktiveeritud asa-aminohappe segu.

3.2.2.1.1 Fmoc-asaAla aktivatsioon BTC-ga

Esimeses katses Fmoc-asaAla prekursoriga viidi eelmises peatükis kirjeldatud aktiveerimise järgselt läbi fosgeenijääkide eemaldamine rotaatoraurusti abil, mida on laialdaselt praktiseeritud asa-peptiidsünteesil [5-7,9]. Eelaktivatsioonisegu kokku aurutamise järgselt lahustati saadud kontsentraat mõnes ml-s kuivas DCM-is ning lisati tsentrifuugituubis olevale dipeptiidile, millele on eelnevalt lisatud uus kogus DIPEA-d (0,82 mmol, 20 ekv).

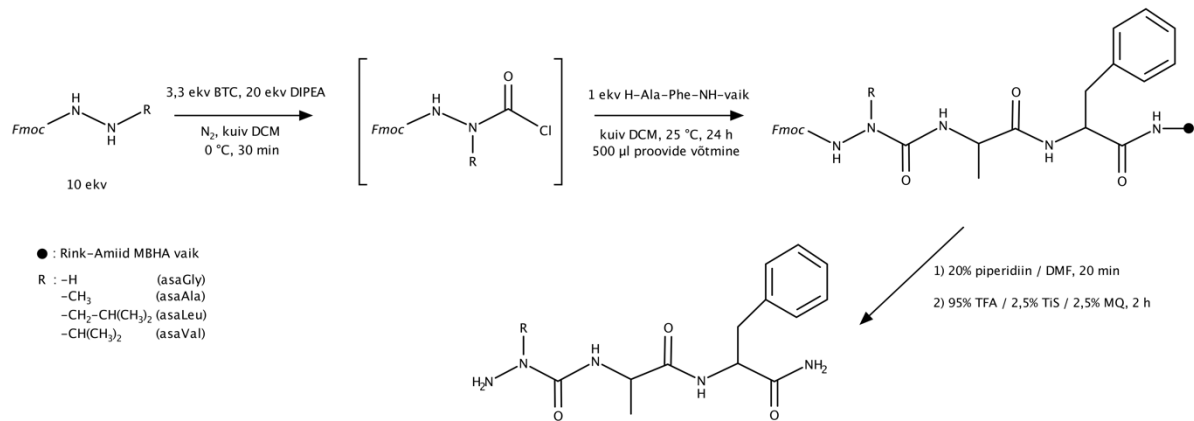
Aktiveeritud Fmoc-asaAla sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik läbi viidud kineetiliste mõõtmiste tulemuste põhjal otsustati järgmiste asa-aminohapete aktiveerimine läbi viia juhindudes eeskirjast, mis ei hõlma fosgeenijääkidest vabanemiseks reaktsioonisegu kontsentreerimist vaakumis.

3.2.2.2 Kineetilised mõõtmised

Alapunktis 3.2.2.1 kirjeldatud aktivatsioonisegu lisamisel tsentrifuugituubis asuvale dipeptiidile käivitati stopperkell. Sidumisreaktsioonil (**Skeem 15**) lasti toimuda 25 °C juures ~24 h konstantse segamisega ning reaktsioonisegust võeti proove kogusega 500 µl fikseeritud ajahetkedel alates stopperkella käivitamisest.

Reaktsioonisegust võetud proov kanti filtriga varustatud 10 ml süstlasse ning reaktsioon peatati jääkide välja pesemise teel (3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF). Sünteesitud tripeptiidilt eemaldati

Fmoc-kaitserühm ning protsessi efektiivsust jälgiti TLC testi abil. Seejärel lisati süstlasse peptiidi tahkelt kandjalt lõikamiseks 1 ml happelist lahust (95% TFA / 2,5% TiS / 2,5% MQ) ning protsessil lasti toimuda 2 h. Reaktsiooni lõppedes filtreeriti süstla sisu 2 ml tsentrifuugituubi, TFA jäägid eemaldati, segu ekstraheeriti 3 x jääkülma eetriga ning tuubi sisu aurustati kuivaks.



Skeem 15. Fmoc-asaAH sidumine dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik aktivaatoriga BTC.

Proove analüüsiti HPLC-MS-ga, kasutades gradientprogrammi (lahus A 0,1% TFA / MQ-s, lahus B 0,1% TFA / ACN-s; lahus B kontsentratsioon 5–30%; proove elueeriti 19. minuti jooksul voolukiirusel 1 ml/min). Lähteaine ja produkti piikide pindalade (S) kaudu arvutati lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ kadumine ajas:

$$Y = \frac{S_{\text{lähtepeptiid}}}{S_{\text{lähtepeptiid}} + S_{\text{produkt}}}$$

Võrrand 1

Reaktsiooni kirjeldab pseudo-esimest järku kiiruse võrrand

$$Y = e^{-k_{\text{obs}} t} + Y_{\infty}$$

Võrrand 2

kus k_{obs} on esimest järku reaktsiooni näiline kiiruskonstant, t on aeg minutites ning Y_{∞} on platoo väärtus, mis kirjeldab reaktsiooni lõppu.

3.2.3 H-asaGly-Ala-Phe-NH₂ süntees

3.2.3.1 Fmoc-asaGly prekursori aktivatsioon ja sidumine BTC-ga

Esmalt prooviti Fmoc-asaGly prekursori aktiveerimist kasutades BTC-d peatükis 3.2.2.1 kirjeldatud eeskirja alusel. Kuna prekursor ei lahustunud 3,5 ml kuivas DCM-is, lisati segule täiendavalt 1,5 ml kuiva DMF-i ning soojendati segu 40 °C juures. Fmoc-asaGly prekursori lahustumisel jätkati punktis 3.2.2.1 kirjeldatud juhise alusel, kuid tahkel kandjal oleva lähtepeptiidi ülekandmine 50 ml tsentrifuugituubi viidi läbi 4,5 ml kuiva DCM-iga.

Järgnevalt katsetati Fmoc-asaGly prekursori aktiveerimisel kuiva DMF-i. Juhinduti punktis 3.2.2.1 toodud eeskirjast, kuid prekursor lahustati 4,5 ml kuivas DMF-is ning lähtepeptiidi ülekandmiseks kasutati 5 ml kuiva DCM-i.

Seejärel kasutati kuiva DMF-i nii Fmoc-kaitstud prekursori aktiveerimisel kui ka dipeptiidi ülekandmisel: prekursor lahustati 3,5 ml kuivas DMF-is ning ülekandmine tsentrifuugituubi toimus 6 ml kuiva DMF-iga.

Kõigil kolmel juhul viidi sidumisreaktsiooni kineetilised mõõtmised läbi alapunkti 3.2.2.2 alusel.

3.2.3.2 Reaktsioonitingimuste varieerimine Fmoc-asaGly sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik

Kirjanduses asaGly sidumiseks kasutatud meetodite testimiseks viidi paralleelselt läbi 5 katset filtriga varustatud 10 ml süstaldes, kuhu kaaluti tahkele kandjale kinnitatud dipeptiid, millelt oli eemaldatud Fmoc-kaitserühm (0,01 mmol, 1 ekv). Kõigi katsete korral lahustati Fmoc-asaGly prekursor (0,1 mmol, 10 ekv) lämmastikuga ventileeritud kolvis 2,375 ml kuivas DMF-is. Esimese kahe katse korral lisati reaktsioonisegusse 35 µl DIPEA-d (0,2 mmol, 20 ekv), misjärel jahutati segu 0 °C-ni. Esimeses neljas katses kasutati aktivaatorina trifosgeeni (0,03 mmol, 3,3 ekv), mis lahustati 125 µl kuivas DCM-is ning lisati reaktsioonisegusse. Viienda katse korral kasutati aktivaatorina DSC (0,1 mmol, 10 ekv), mis lahustati 375 µl DMF-is. Esimese nelja katse korral lasti eelaktivatsioonil lämmastiku keskkonnas toimuda 30 minutit, millest esimesed 5 minutit 0 °C juures, misjärel eemaldati jäävann ning temperatuuril lasti tõusta toatemperatuurini. Viienda katse korral toimus eelaktivatsioon 5 minutit ning

toatemperatuuril. Kolmanda katse korral lisati DIPEA alles 5 minutit enne eelaktivatsiooni lõppu, neljanda ja viienda katse korral DIPEA-d ei lisatud.

Eelaktivatsiooni reaktsioonide lõppedes tõmmati aktiveeritud Fmoc-asaGly segu süstlasse ning sidumisreaktsioonil lasti loksutil toimuda 24 h. Teise katse korral eemaldati süstlast 3 h möödumisel katse algusest reagentide jäägid ning süstlasse tõmmati uus aktiveeritud Fmoc-asaGly lahus. 24 h möödumisel lõpetati kõigis süstaldes katsed reagentide väljapesemise teel, eemaldati Fmoc-kaitserühm ning vabastati peptiidid tahkelt kandjalt. Reaktsioonide tulemit analüüsiti HPLC-MS-ga, arvutades lähtepeptiidi piigi pindala suhte lähte- ja produktpeptiidi piikide pindalade summasse (**Võrrand 1**).

Kokkuvõtlik tabel paralleelkatsete käigus varieeritud tingimustest (**Tabel 6**) asub peatükis 4.3.1.

3.2.3.3 Fmoc-asaGly prekursori aktivatsioon ja sidumine DSC-ga

asaGly aktiveeriti aktivaatoriga DSC kasutades kirjandusest leitud eeskirja [10,57], mida kohandati meie uurimisgrupis sidumisreaktsiooni jälgimiseks välja töötatud kineetilise meetodiga.

Reaktsioonikolbi kaaluti Fmoc-kaitstud asa-glütsiini prekursor (0,41 mmol, 10 ekv), mis lahustati 3,5 ml DMF-is. Seejärel lisati prekursorile 1,5 ml DMF-is lahustatud aktivaator DSC (0,41 mmol, 10 ekv) ning aktivatsiooniprotsessil lasti toatemperatuuril toimuda 5 minutit. Eelaktivatsiooni järgselt lisati aktiveeritud segu 5 ml DMF-iga tsentrifuugituubi üle kantud dipeptiidile ning sidumisreaktsiooni kineetilised mõõtmised viidi läbi järgides alapeatükis 3.2.2.2 kirjeldatud eeskirja.

3.2.4 Asa-tripeptiidi H-asaAla-Val-Phe-NH₂ süntees ja kineetilised mõõtmised

Asa-alaniini prekursor aktiveeriti ja lisati dipeptiidile H-Val-Phe-NH₂-vaik põhinedes peatükis 3.2.2.1 välja toodud eeskirjale ning kineetilised mõõtmised teostati alapunkti 3.2.2.2 alusel.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Dipeptiidide Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Val-Phe-NH-vaik süntees

Asa-aminohapete sidumise efektiivsuse uurimiseks peptiidahelasse aktivaatoriga BTC sünteesiti teadustöö raames lähteainetena 2 mudel-dipeptiidi. Nende lähtepeptiidide aminohappelise järjestuse valimisel lähtuti meie teadusgrupi uurimistöös kasutatud mudel-peptiidi aminohappelisest järjestusest [5].

Dipeptiidid H-Ala-Phe-NH-vaik ja H-Val-Phe-NH-vaik sünteesiti tuginedes punktis 3.2.1 kirjeldatud eeskirjale. Mõlemal juhul seoti esimese aminohappena kaitsmata tahkele kandjale Phe (**Lisa 1, etapp 1, Lisa 2, etapp 1**), mille kinnitumist tahkele kandjale kontrolliti Kaiseri testiga (**Tabel 1, Tabel 2**). Seejärel eemaldati Phe-lt Fmoc-kaitserühm, mille efektiivsust jälgiti KT ja TLC testidega (**Tabel 1, Tabel 2**). Järgnevalt seoti esimese dipeptiidi korral Phe-le Ala (**Lisa 1, etapp 2**) ning sidumise efektiivsuse kontrollimiseks tehti ninhüdrini ja TLC testid (**Tabel 1**). Sünteesitud dipeptiidile sooritati täiendavaks kontrolliks HPLC-MS analüüs (**Lisad 3–4**).

Tabel 1. Dipeptiidi Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik sünteesietappide edukuse jälgimine.

<u>Süntees</u>	<u>KT (Fmoc-kaitserühma eemaldamine)</u>	<u>KT (AH sidumisreaktsiooni edukuse jälgimine)</u>	<u>TLC test</u>
Fmoc-Phe-NH-vaik	+	-	+
Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik	+	-	+

Teise dipeptiidi korral kinnitati vaba *N*-terminaalse otsaga Phe-le Val (**Lisa 2, etapp 2**). Sidumisreaktsiooni edukust kontrolliti standardsete testidega (**Tabel 2**) ning dipeptiidile tehti HPLC-MS analüüs (**Lisad 5–6**).

Tabel 2. Dipeptiidi Fmoc-Val-Phe-NH-vaik sünteesietappide edukuse jälgimine.

<u>Süntees</u>	<u>KT (Fmoc-kaitserühma eemaldamine)</u>	<u>KT (AH sidumisreaktsiooni edukuse jälgimine)</u>	<u>TLC test</u>
Fmoc-Phe-NH-vaik	+	-	+
Fmoc-Val-Phe-NH-vaik	+	-	+

Tabelitest 1 ja 2 võib näha, et aminohapete sidumise protsessid kulgesid edukalt mõlema dipeptiidi sünteesil. Kaiseril ja TLC testide tulemusi kinnitas ka HPLC-MS analüüs, kus kromatogrammi piikide analüüsil ei tuvastatud H-Phe-NH₂ massi, kuid tehti kindlaks vastavalt sünteesitud dipeptiidile H-Ala-Phe-NH₂ ja H-Val-Phe-NH₂ masside olemasolu.

4.2 Fosgeenijääkide eemaldamise mõju asa-tripeptiidi H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ sünteesile

Järgnevalt hakati testima erineva struktuuriga asa-aminohapete peptiidahelasse sidumise efektiivsust, kasutades Fmoc-kaitstud asa-aminohappe prekursori aktiveerimiseks trifosgeeni, mis on seni andnud parimaid tulemusi selle etapi läbiviimisel asa-peptiidi sünteesis. Asa-aminohapete valikul lähtuti külgahela steerilise mahukuse erinevusest [11] ning sellest, et külgahel ei sisaldaks funktsionaal- ega kaitserühmi. Tuginedes meie uurimisgrupi varasemale praktikale, valiti esimeseks asa-aminohappeks asaAla, mis sisaldab kõrvalrühmana väikseima mahukusega alküülühma.

Laialdaselt kasutatud meetod asa-aminohappejääkide peptiidjärjestusse lisamiseks hõlmab aktivaatori trifosgeeni kasutamisel tekkivatest fosgeenijääkidest vabanemist rotaatoraurusti abil [5-7,9]. Käesoleva töö autori bakalaureusetöös uuriti trifosgeeni efektiivsust asa-aminohappele järgneva aminohappe sidumisreaktsioonil ning selgus, et reaktsioon toimub edukamalt ilma fosgeenijääkide eemaldamiseta [12]. Seega otsustati esmalt uurida, kas reaktsioonisegu vaakumis kontsentreerimise etapi kõrvaldamisel asa-aminohappe prekursori aktiveerimise eeskirjast on mõju sidumisreaktsiooni efektiivsusele tahke kandjaga.

Selleks eemaldati dipeptiidilt Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik kaitserühm ning seoti selle vabale N-terminaalsele otsale esmalt Fmoc-asaAla, järgides juhiseid 3.2.2.1 (ilma fosgeenijääkide

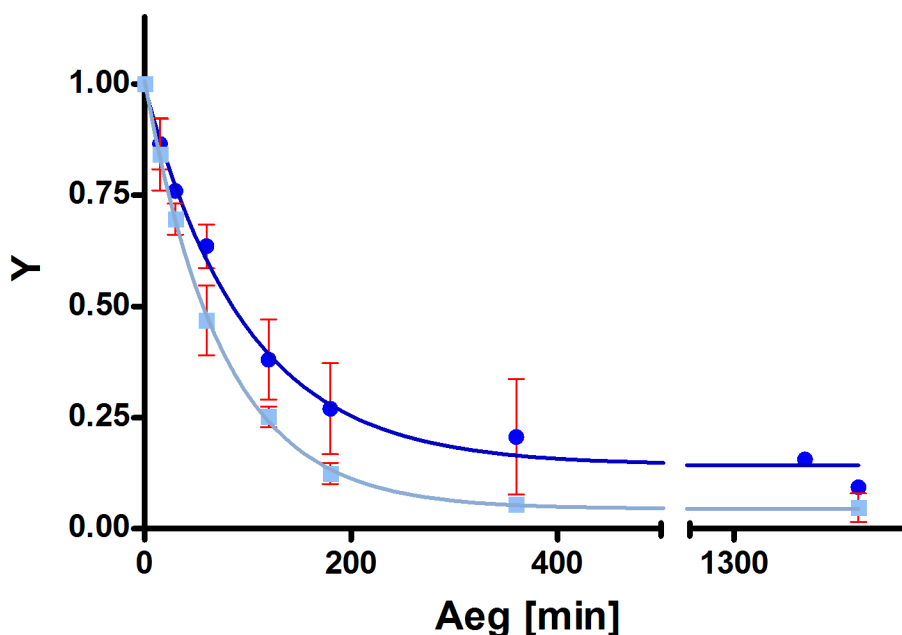
eemaldamiseta) ja 3.2.2.1.1 (fosgeenijääkide eemaldamisega) (**Lisa 1, etapp 3.1**). Kineetilised mõõtmised teostati mõlema eeskirja korral punkti 3.2.2.2 alusel pseudo-monomolekulaarsetes tingimustes, võttes asa-aminohappe prekursorit 10-kordses ülehulgas tahke kandja suhtes. Reaktsiooni toimumist jälgiti 24 h jooksul, konstantse temperatuuri tingimustes. Reaktsioonisegust võetud proovidelt eemaldati Fmoc-kaitserühm ning neid analüüsiti HPLC-MS-ga (**Lisad 8–11**). Määrati produkti (H-asaAla-Ala-Phe-NH₂) ja lähtepeptiidi (H-Ala-Phe-NH₂) piikide pindalade suhe (**Võrrand 1**) ning arvutati kolme paralleelkatse põhjal reaktsioonide I järku näilised kiiruskonstandid (k_{obs}) ja saagised ($1 - Y_{\infty}$) mõlema protsessi jaoks (**Võrrand 2**)(**Tabel 3**).

Tabel 3. Kineetiliste mõõtmiste tulemused BTC-ga aktiveeritud Fmoc-asaAla sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH₂-vaik kuivas DCM-is temperatuuril 25 °C.

<u>Protsess</u>	<u>k_{obs} [min⁻¹]</u>	<u>Saagis ($1 - Y_{\infty}$)</u>
Fosgeenijääkide eemaldamine	0,010 ± 0,001	0,86 ± 0,03
Fosgeenijääkide mitte-eemaldamine	0,013 ± 0,001	0,96 ± 0,02

Tabelis 3 välja toodud ning **Joonisel 1** visualiseeritud tulemustest võib näha, et mõlemad reaktsioonid kulgevad praktiliselt lõpuni ja aktiveeritud asa-aminohapet sisaldava reaktsioonisegu kokkuaurutamisel vaakumis toimub asaAla sidumisreaktsioon ainult mõnevõrra aeglasemalt ning madalama saagisega kui fosgeenijääkide mitte-eemaldamisel. Varasemalt on fosgeeni või trifosgeeniga aktiveeritud asa-aminohapete sidumiseks peptiidjärjestusse kasutatud väga erinevaid reaktsiooniaegu: 3 h, 12 h kuni üleöö [5,6,9,10]. Samuti on saagise suurendamise eesmärgil kasutatud peale 12 h möödumist reaktsiooni algusest sidumisreaktsiooni kordamist, lisades tahkele kandjale uue koguse reagente [10]. **Jooniselt 1** on näha, et antud tingimustel läbi viidud sidumisreaktsioonis asaAla-ga saavutab sidumisreaktsiooni saagis fosgeenijääkide eemaldamisel platooväärtuse umbes 6 h jooksul ning ilma reaktsioonisegu kontsentreerimiseta isegi kiiremini. Samuti ilmnes, et kineetiliste mõõtmiste reprodutseeritavus on parem, kui reaktsiooniseguga eelaktivatsiooni järgselt ei manipuleerita, mida näitavad väiksemad veapiirid fosgeenijääkide mitte-eemaldamise korral.

Kuna HPLC kromatogrammilt ei täheldatud ka suurt erinevust lisandite koguses, otsustati seeria järgmiste asa-aminohapete sidumiseks kasutada eeskirja 3.2.2.1.



Joonis 1. Fmoc-asaAla sidumisreaktsiooni kineetilised kõverad kuivas DCM-is temperatuuril 25 °C mudel-asa-peptiidis H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ aktivaatoriga BTC, kasutades asaAla aktiveerimisprotsessil fosgeenijääkide eemaldamist (●) ja mitte-eemaldamist (■).

4.3 Asa-aminohappe struktuuri mõju H-asaAH-Ala-Phe-NH₂ sünteesile

Saamaks teada, kas asa-aminohappe sidumise efektiivsus sõltub selle külghela struktuurist, viidi järgnevalt läbi kineetilised mõõtmised lisaks asaAla-le veel kolme erineva asa-aminohappe – asaLeu, asaVal ja asaGly – sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH₂-vaik (**Lisa 1, etapp 3.1, Lisa 7**). Fmoc-asaLeu ning Fmoc-asaVal lisati tahkel kandjal olevale lähtepeptiidile järgides punktis 3.2.2.1 kirjeldatud eeskirja. Sama juhise järgi ei õnnestunud aga Fmoc-asaGly lisamine, mistõttu arutletakse esialgu kolme asa-aminohappe – asaAla, asaLeu ja asaVal – struktuuri mõju sidumisreaktsioonile (vt asaGly-ga saadud tulemuste arutelu peatükis 4.3.1). Asa-aminohapete asaAla, asaLeu ja asaVal dipeptiidile H-Ala-Phe-NH₂-vaik sidumise kineetiliste mõõtmiste tulemused kolme paralleelkatse põhjal on toodud **Tabelis 4** ning visualiseeritud **Joonisel 2**.

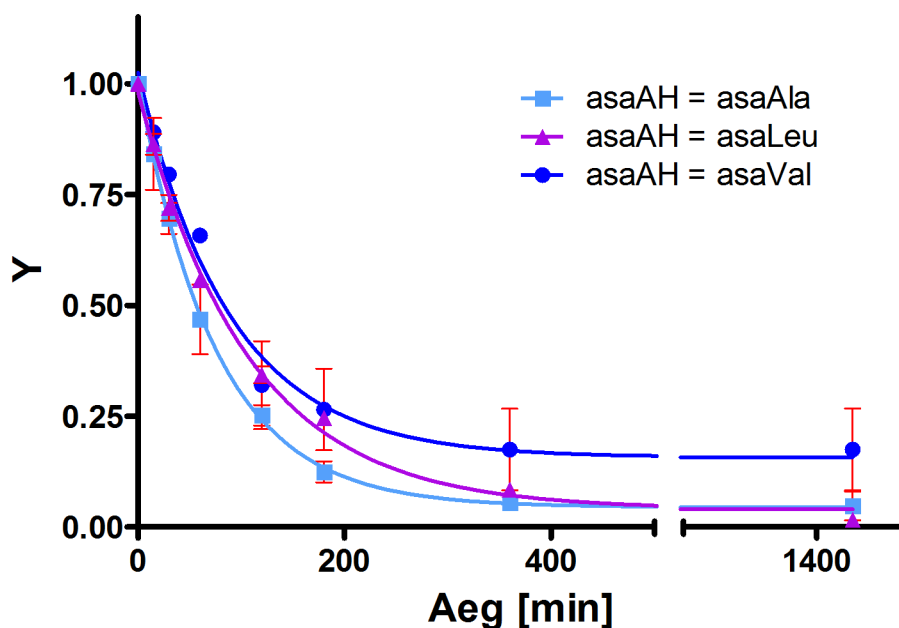
Tabel 4. Kineetiliste mõõtmiste tulemused asa-aminohapete (Fmoc-asaAH) sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik kuivas DCM-is aktivaatoriga BTC 25 °C juures.

<u>Fmoc-asaAH</u>	<u>k_{obs} [min⁻¹]</u>	<u>Saagis (1 - Y_{∞})</u>
Fmoc-asaAla	0,013 ± 0,001	0,96 ± 0,02
Fmoc-asaLeu	0,0094 ± 0,0005	0,96 ± 0,02
Fmoc-asaVal	0,011 ± 0,002	0,86 ± 0,05

Selgus, et testitud asa-aminohapete sidumisreaktsioonide efektiivsus tahkele kandjale ei sõltu asa-aminohappe külghela struktuurist: steriilselt kõige mahukama kõrvalahelaga asaVal sidumine kulgeb peaaegu sama kiiresti ja ligikaudu samasuguse saagisega, kui asaAla sidumine (**Tabel 4**), mistõttu võib väita, et lisatava asa-aminohappe kõrvalrühma mahukus ei mõjuta reaktsiooni kiirust ega saagist. Samuti kulgeb reaktsioon kõigi asa-aminohapete korral praktiliselt lõpuni. Seega võib nende asa-aminohapete sidumisel peptiidahelasse, kasutades aktivaatorina BTC-d, rakendada ühesugust eeskirja.

Varasemalt on kineetilisel meetodil testitud Ala sidumist sama aminohappelise järjestusega dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik aktivaatoritega COMU ja PyOxim [5] ning see toimub ligikaudu 80 korda kiiremini, kui asaAla sidumine sellele dipeptiidile. Kuna BTC-d on edukalt kasutatud ka tavapeptiidsünteesil [70,71] ja aktivaatori valik peptiidsünteesi efektiivsust praktiliselt ei mõjuta [72], on tõenäoliselt asa-aminohappe oluliselt väiksem reaktsioonivõime seostumisel eelneva aminohappe *N*-terminaalse otsaga tingitud karbonüülrühma elektrofiilsuse vähenemisest [1] võrreldes sellele vastava aminohappe karbonüülrühma elektrofiilsusega.

Antud reaktsioonitingimustes seondub asa-aminohape tahkele kandjale sõltumata kõrvalahela mahukusest umbes 6 h jooksul, mil enamus lähteainest on ära reageerinud (**Joonis 2**). Sellest võib järeldada, et tõenäoliselt on asa-aminohappe sidumist peptiidjärjestusse aktivaatoriga BTC otstarbekam läbi viia, lastes reaktsioonil toimuda vähem kui 12 h ning pigem tuleks saagise suurendamiseks vajadusel sidumisprotsessi korrata, lisades reagente 12 h asemel oluliselt varem.



Joonis 2. Asa-aminohapete (asaAla, asaLeu, asaVal) sidumise kineetilised kõverad aktivaatoriga BTC kuivas DCM-is temperatuuril 25 °C mudel-asapeptiidis H-asaAH-Ala-Phe-NH₂.

4.3.1 Fmoc-asaGly sidumine dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik

Fmoc-kaitstud asaGly sidumiseks dipeptiidile prooviti esmalt selle prekursorit aktiveerida eeskirja 3.2.2.1 alusel, kuid Fmoc-hüdrasiini lahustumisprobleemide tõttu kuivas DCM-is toimiti punktis 3.2.3.1 kirjeldatu järgi: kuivas DCM-is olevale prekursorile lisati ka kuiva DMF-i ning segu soojendati 40 °C juures prekursori lahustumiseni. Seejärel jätkati prekursori aktiveerimist punktis 3.2.2.1 toodud juhendi alusel. Eelaktivatsiooniprotsessi 22. minutil täheldati valge sademe teket reaktsioonikolvis. Kuna polnud selge, kas tegemist on lahusest välja sadenenud asaGly prekursoriga või mõne reaktsiooni käigus tekkinud kõrvalproduktiga, lisati segu dipeptiidile ning viidi läbi sidumisreaktsiooni kineetilised mõõtmised peatükk 3.2.2.2 järgi. Sademe tekkest hoolimata õnnestus asaGly siduda tahke kandjaga, kuid reaktsiooni saagis ei olnud eriti kõrge (**Tabel 5, I**)(**Lisa 1, etapp 3.1**).

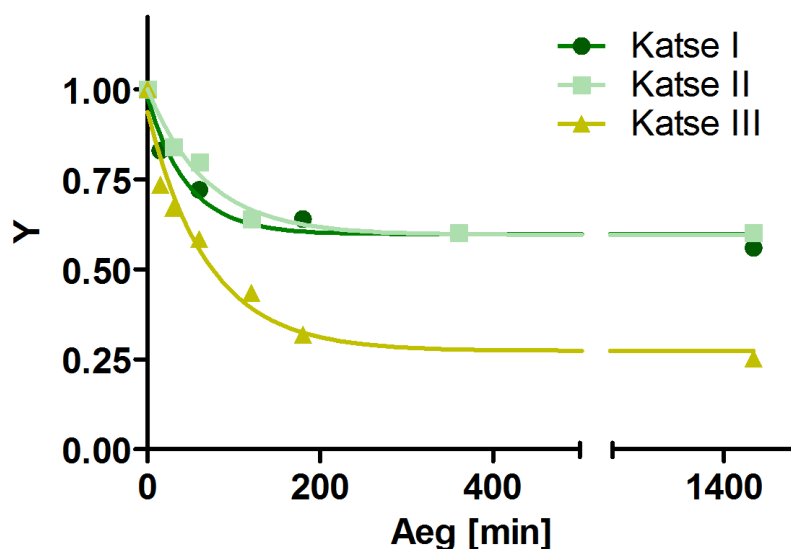
Tabel 5. Solventide varieerimine ja kineetiliste mõõtmiste tulemused Fmoc-asaGly sidumisel dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik 25 °C juures.

	<u>Reaktsioonikeskkond</u>	<u>k_{obs} [min⁻¹]</u>	<u>R^2</u>	<u>Saagis (1 - Y_{∞})</u>
I	Kuiv DCM / kuiv DMF (~5:1)	0,022 ± 0,009	0,96	0,40 ± 0,04
II	Kuiv DCM / kuiv DMF (~1:1)	0,015 ± 0,003	0,98	0,40 ± 0,02
III	Kuiv DMF	0,014 ± 0,004	0,97	0,73 ± 0,05

Kuna madal saagis võis olla tingitud aktivatsiooniprotsessi käigus aset leidnud sademe tekkest, viidi järgneval katsel Fmoc-asaGly prekursori aktivatsiooniprotsess läbi kuivas DMF-is, kuid dipeptiidi ülekandmisel kasutati jätkuvalt kuiva DCM-i. Vaatamata sellele, et DMF ei ole BTC kasutamisel sobivaim solvent, sest aktivaator võib lahustiga reageerida [7], otsustati seda siiski kasutada hüdrasiini parema lahustuvuse tõttu DMF-is võrreldes DCM-iga. Kuigi sellel katsel sademe teket ei täheldatud, ei esinenud muutust sidumisreaktsiooni saagises (**Tabel 5, II**).

Viimaks otsustati nii Fmoc-kaitstud prekursori aktiveerimine kui ka dipeptiidi ülekandmine viia läbi kuivas DMF-is, mis viis reaktsionisaagise peaaegu kahekordse suurenemiseni võrreldes katsetega **I** ja **II** (**Tabel 5, III**).

Tabelis 5 toodud kiiruskonstandid, mis on saadud ühe katse tulemuste põhjal, ei võimalda enne kordusmõõtmiste sooritamist kindlaid järeldusi teha selle kohta, kas asaGly sidumine dipeptiidile toimub sõltumata reaktsioonikeskkonnast ligikaudu sama kiiresti või kiiremini kui teiste asa-aminohapete korral. Katsete **I**, **II** ja **III** kineetiliste mõõtmiste tulemused on visualiseeritud ka **Joonisel 3**.



Joonis 3. Fmoc-asaGly sidumisreaktsiooni kineetilised kõverad dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik erinevates reaktsioonikeskkondades temperatuuril 25 °C aktivaatoriga BTC.

Nagu kirjanduse ülevaates mainitud, on glütsiin unikaalne aminohape, erinedes teistest aminohapetest kõrvalahela puudumise tõttu [64]. Kuigi asa-glütsiini peptiidjärjestusse lisamiseks on kasutatud sarnaselt teistele asa-aminohapetele trifosgeeniga aktiveerimist, võib selle meetodi kasutamisel tekkida kõrvalproduktina oksadiasooloon, mis pärsib soovitud asa-peptiidi moodustumist [10,51,57,65,66]. Lisaks on mõningates uurimustes täheldatud Fmoc-kaitserühma ennatlikku eemaldumist aluse mõjul [46].

Kuigi eelnevalt kirjeldatud katsetes õnnestus reaktsioonikeskkonna varieerimise teel asa-tripeptiidi H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ saagist suurendada, jäi see veidi madalamaks võrreldes teiste asa-aminohapete sidumisreaktsioonidega saavutatud saagistega. Seega otsustati vastavalt peatükis 3.2.3.2 kirjeldatule paralleelselt läbi viia reaktsioonid vähendatud tahke kandja kogusega, kus varieeriti erinevaid reaktsioonitingimusi aktivatsiooniprotsessil (**Lisa 1, etapp 3.1**) ning katsetati lisaks BTC-le kirjanduses asaGly sidumisel häid tulemusi andnud aktivaatorit DSC (**Lisa 1, etapp 3.2**)(**Tabel 6**).

Tabel 6. Paralleelselt kuivas DMF-is läbi viidud Fmoc-asaGly aktivatsiooni käigus varieeritud tingimused ning tulemused 24 h möödumisel toatemperatuuril alates Fmoc-asaGly sidumisreaktsiooni algusest dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik.

	<u>Aktivaator</u>	<u>DIPEA lisamine</u>	<u>Muu</u>	<u>Saagis (1 – Y)^a</u>
1. katse	BTC	Eelaktivatsiooni alguses		– ^c
2. katse	BTC	Eelaktivatsiooni alguses	3 h möödudes lisati uus kogus reagenti ^b	0,43
3. katse	BTC	5 min enne eelaktivatsiooni lõppu		– ^c
4. katse	BTC	Ei lisatud üldse		0,09
5. katse	DSC	Ei lisatud üldse		0,92

^a Arvutatud Võrrandi 1 alusel

^b Eemaldati reaktsioonisegu ning asendati värskelt aktiveeritud Fmoc-asaGly-ga

^c HPLC kromatogrammil leidis vaid produkti jälgi

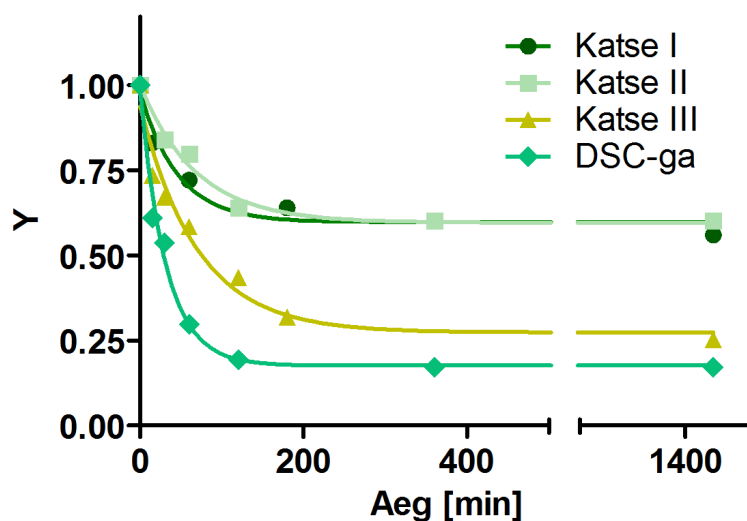
1. katse korral lahustati Fmoc-asaGly kuivas DMF-is ehk eelaktivatsioon viidi läbi sarnaselt kineetiliste mõõtmiste katse **III**-le, et olla võrdluspunktiks teistele katsetele. Analüüsil ilmnes, et Fmoc-asaGly sidumisreaktsioon dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik ei olnud praktiliselt üldse toimunud ning HPLC kromatogrammil oli võimalik tuvastada vaid produkti jälgi. Kuna sidumisreaktsioon süstlas ei suuda piisavalt imiteerida kineetiliste mõõtmiste korral kasutatavaid tingimusi segamise osas, võis juhtuda, et 1. katse korral ei toimunud korralikku reagentide segunemist.

Esimesena katsetati, kas reagentide lisamine tahkele kandjale ajahetkel, kus reaktsiooni kineetiline kõver peaks hakkama saavutama platood, suurendab asaGly sidumise saagist (2. katse). Selleks ajapunktiks valiti eelnevalt teostatud asaGly sidumise kineetiliste mõõtmiste (katsete **I – III**, **Joonis 3**) põhjal 3 h alates sidumisreaktsiooni algusest. 24 h möödumisel sidumisreaktsiooni algusest dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik oli saagiseks 43%, mis võib küll viidata, et reagentide juurde lisamine katse käigus aitab kaasa saagise suurenemisele, kuid neid tulemusi ei saa antud juhul millegagi võrrelda, kuna võrdluskatsena läbi viidud 1. katse ebaõnnestus.

Järgnevalt uuriti tuginedes kirjanduses avaldatud meetodikatele, kas DIPEA lisamine eelaktivatsiooni reaktsiooni lõpuperioodil [10] (3. katse) või lisamata jätmine [46] (4. katse) omab sidumisreaktsioonil tahke kandjaga mõju reaktsiooni saagisele. 3. katse korral moodustus soovitatavat asa-tripeptiidi sarnaselt 1. katsele minimaalselt, kuid 4. katse korral toimus dipeptiidi konversioon asa-tripeptiidiks väga madala saagisega. Kuna igat katset viidi läbi üks kord, oleks põhjapanevamate järelduste tegemiseks vajalik DIPEA mõju edasine uurimine ning katse ülesehituse optimeerimine.

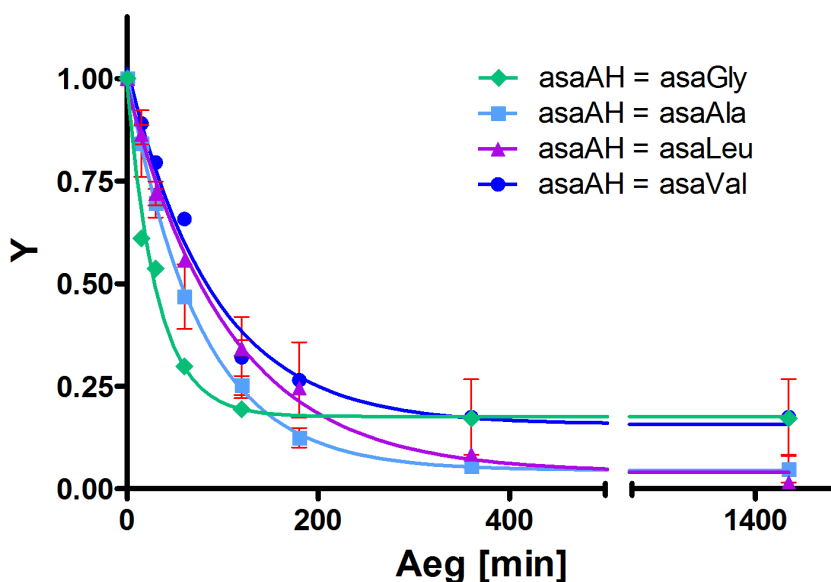
Viimaks prooviti asaGly peptiidjärjestusse sidumist hiljuti häid tulemusi andnud meetodiga, mis põhineb asaGly prekursori aktiveerimisel aktivaatoriga DSC (5. katse) [10,57]. Sellel meetodil on asa-aminohappe prekursori aktiveerimist oluliselt mugavam läbi viia kui aktivaatoriga BTC, kuna protsess toimub toatemperatuuril ning lahustina kasutatav DMF ei pea olema eelnevalt kuivatatud. Antud katse korral saavutati paralleelreaktsioonidest kõige parem tulemus: asa-peptiid H-asaGly-Ala-Phe-NH₂ moodustus 92% saagisega.

Ajendatuna Fmoc-asaGly peptiidjärjestusse lisamise sidumisreaktsiooni, kus aktivaatorina kasutati DSC, suurest saagisest võrreldes teiste katsetega, otsustati paremaks võrdluseks katsetega, kus kasutati BTC-d, teostada selle aktivaatoriga ka asaGly dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik sidumise kineetilised mõõtmised. Selleks aktiveeriti Fmoc-kaitstud asaGly prekursor vastavalt punktis 3.2.3.3 toodud eeskirjale ning viidi läbi kineetilised mõõtmised, järgides juhust peatükis 3.2.2.2 (**Lisa 1, etapp 3.2**). Katse viidi läbi üks kord, millest selgus, et Fmoc-asaGly prekursori aktiveerimisel DSC-ga toimub sidumisreaktsioon võrreldes nii asaGly sidumise katsetega **II – III (Tabel 5)**, kui ka teiste asa-aminohapete sidumisega peptiidjärjestusse (**Tabel 4**), kiiremini ($k_{\text{obs}} = 0,032 \pm 0,005$). Kõnealuses eksperimendis sünteesitud asa-tripeptiidi H-asaGly-Ala-Phe-NH₂ saagis ($1 - Y_{\infty} = 0,82 \pm 0,04$) on võrreldav või veidi suurem, kui asaGly sidumisel katsel **III** saadud tulemus ning on sarnane teiste asa-tripeptiidide saagistega (**Tabel 4**). Kokkuvõtlik võrdlus Fmoc-asaGly sidumisel H-Ala-Phe-NH-vaigule kineetiliste mõõtmiste teel saadud tulemustest on visualiseeritud **Joonisel 4** ning erinevate asa-aminohapetega läbi viidud kineetiliste mõõtmiste tulemused dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik on visualiseeritud **Joonisel 5**.



Joonis 4. Fmoc-asaGly dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik sidumise kineetiliste mõõtmiste tulemused 25 °C juures erinevate aktivaatorite ja reaktsioonikeskkondade kasutamisel.

Seega võib antud reaktsioonitingimustes läbi viidud eksperimentide põhjal järeldada, et asaGly sidumiseks peptiidjärjestusse on optimaalne kasutada teistest asa-aminohapetest erinevat meetodit.



Joonis 5. Fmoc-asaAH dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik sidumisreaktsioonide kineetiliste mõõtmiste tulemused 25 °C juures kasutades asaAla, asaLeu ja asaVal sidumiseks kuivas DCM-is aktivaatorit BTC ning asaGly sidumiseks DMF-is aktivaatorit DSC.

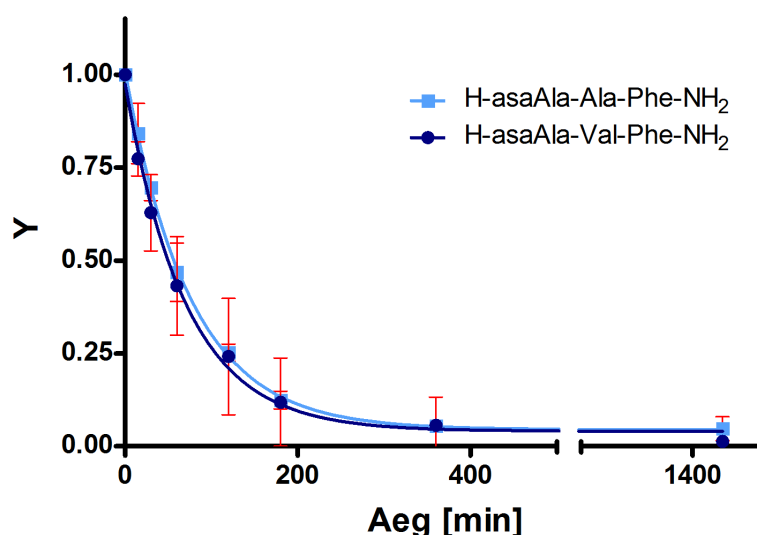
4.4 Asa-aminohappele eelneva aminohappe struktuuri mõju H-asaAla-AH-Phe-NH₂ sünteesile

Uurimaks, kuidas mõjutab asa-aminohappe sidumisreaktsiooni efektiivsust sellele järjestuses eelneva aminohappe kõrvalrühma mahukus, lisati teisele sünteesitud dipeptiidile (H-Val-Phe-NH-vaik) asaAla vastavalt punktile 3.2.4 (**Lisa 2, etapp 3**). Nimetatud lähtepeptiidi järjestusse valiti Val kõrvalahela suurema steerilise mahukuse tõttu, võrreldes Ala kõrvalahela mahukusega. Saadud kineetiliste mõõtmiste tulemusi võrreldi asaAla sidumise tulemustega järjestusele H-Ala-Phe-NH-vaik (**Tabel 7**).

Tabel 7. Kineetiliste mõõtmiste tulemused Fmoc-asaAla sidumisel aktivaatoriga BTC dipeptiididele H-Ala-Phe-NH-vaik ja H-Val-Phe-NH-vaik 25 °C juures kuivas DCM-is.

Lähtepeptiid	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$	Saagis ($1 - Y_{\infty}$)
H-Ala-Phe-NH-vaik	$0,013 \pm 0,001$	$0,96 \pm 0,02$
H-Val-Phe-NH-vaik	$0,014 \pm 0,002$	$0,96 \pm 0,03$

Tulemustest selgus, et näiliste kiiruskonstantide ning saagiste väärtused ei erine üksteisest, mistõttu võib öelda, et asa-aminohappe järjestusse lisamise efektiivsus praktiliselt ei sõltu sellele järjestuses eelneva aminohappe kõrvalahela struktuurist (**Joonis 6**).



Joonis 6. Asa-tripeptiidides H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ ja H-asaAla-Val-Phe-NH₂ Fmoc-asaAla ja dipeptiidi vaheliste sidumisreaktsioonide kineetilised kõverad aktivaatoriga BTC kuivas DCM-is temperatuuril 25 °C.

5. Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli välja selgitada asa-aminohappe struktuuri mõju sidumisreaktsiooni efektiivsusele mudel-asapeptiidis H-asaAH-Ala-Phe-NH₂. Lisaks uuriti ühe asa-aminohappe (asaAla) dipeptiidile H-Val-Phe-NH-vaik sidumise näitel, kas lisatavale asa-aminohappele eelneva aminohappe struktuur mõjutab sidumise efektiivsust. Selleks sünteesiti kaks dipeptiidi – H-Ala-Phe-NH-vaik ja H-Val-Phe-NH-vaik – ning jälgiti kineetilisel meetodil esimesele dipeptiidile erineva steerilise mahukusega asa-aminohapete seeria (asaAla, asaVal, asaLeu ja asaGly) ning teisele dipeptiidile ühe asa-aminohappe, milleks oli asaAla, sidumise efektiivsust aktivaatoriga trifosgeen.

Selgus, et dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik seotava asa-aminohappe kõrvalahela struktuur praktiliselt ei mõjuta sidumisreaktsiooni kiirust ning mõjutab reaktsiooni saagist väga vähesel määral. Samas ilmnes, et asa-aminohappe sidumine peptiidahelasse toimub ligikaudu 2 suurusjärku aeglasemalt, kui tavalise aminohappe lisamine peptiidjärjestusse. See on tõenäoliselt tingitud aminohappe asa-analoogi karbonüülrühma elektrofiilsuse vähenemisest võrreldes aminohappe karbonüülrühma elektrofiilsusega. Vaatamata sellele kulges asa-aminohapetega asaAla, asaLeu ja asaVal sidumisreaktsioon tahkele kandjale praktiliselt lõpuni umbes 6 h jooksul. Sellest järeldati, et tõenäoliselt on optimaalsem lasta asa-aminohappe sidumisreaktsioonil peptiidjärjestusse aktivaatoriga BTC toimuda kirjanduses välja toodud 12 h või veel pikemate reaktsiooniaegade asemel eelmainitud aja jooksul, vajadusel sidumisprotsessi korrates. Lisaks tuli välja, et asaGly korral on aga trifosgeeni asemel otstarbekam kasutada selle sidumist peptiidjärjestusse aktivaatoriga DSC.

Võrreldes omavahel asaAla sidumise efektiivsust järjestustesse H-Ala-Phe-NH₂ ja H-Val-Phe-NH₂ aktivaatoriga trifosgeen ilmnes, et asa-aminohappe reaktsioonivõime praktiliselt ei sõltu sellele järjestuses eelneva aminohappe kõrvalahela mahukusest. Seega võib asa-aminohapete lisamiseks peptiidjärjestusse aktivaatoriga BTC rakendada ühesugust eeskirja sõltumata asa-aminohappe või sellele eelneva aminohappe alküül-kõrvalahela struktuurist. AsaGly sidumiseks peptiidjärjestusse on aga sobivam kasutada aktivaatorit DSC.

Summary

Peptides have several different functions in naturally occurring processes which make them promising drug candidates. Due to their low enzymatic degradation, selectivity and bioavailability in organisms, various peptidomimetics have developed. One possible structural modification of peptides is based on replacing α -carbon with nitrogen in one or more amino acid residues, obtaining aza-peptides.

Our research group is developing a more effective method for aza-peptide synthesis as currently existing methods do not provide aza-peptides with sufficient yield, interfering the research for their use as drug candidates. Although the most critical step of aza-peptide synthesis is coupling of the following amino acid to the aza-amino acid residue in sequence, we recently discovered that the incorporation of aza-amino acid to the peptide chain, using triphosgene as an activator, is also incomplete. Based on literature, triphosgene is the most used coupling reagent for this reaction but existing methods seem to be sub-optimal using different reaction times and the need of repeating the procedure.

The aim of this research was to evaluate the impact of aza-amino acid side chain to the coupling efficiency, using triphosgene as a coupling reagent in model aza-peptide H-azaAA-Ala-Phe-NH₂. As a result of kinetic measurements, the incorporation of azaAla, azaLeu and azaVal to the peptide sequence is completed within 6 hours and aza-amino acid side chain steric bulkiness does not have impact on the rate nor yield of the coupling reaction. On the other hand, effective coupling of azaGly was obtained using an alternative method which utilizes DSC as a coupling reagent. Surprisingly, the amino acid aza-analogue couples to the peptide at 2 orders of magnitude slower compared to the parent amino acid. Presumably, it is caused by the reduced electrophilicity of aza-amino acid carbonyl group in comparison with the amino acid carbonyl group.

In addition, the impact of the side chain steric bulkiness of amino acid residue preceding the coupled aza-amino acid was also examined, comparing the coupling reaction efficiency of azaAla in model aza-peptides H-azaAla-Ala-Phe-NH₂ and H-azaAla-Val-Phe-NH₂. Results of kinetic measurements indicated that the side chain structure of amino acid residue preceding the aza-amino acid has no influence on coupling efficiency.

Kasutatud kirjandus

- [1] Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modification of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3575–3594.
- [2] Begum, A.; Sujatha, D.; Prasad, K. V. S. R. G.; Bharathi, K. A Review on Azapeptides: The Promising Peptidomimetics. *Asian J. Chem.* **2017**, *29* (9), 1879–1887.
- [3] Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational Properties of Azapeptides. *J. Mol. Struct.* **1999**, *469*, 63–76.
- [4] Dutta, A. S.; Morley, J. S. Polypeptides. Part XIII. Preparation of α -Aza-Amino-Acid (Carbamic Acid) Derivatives and Intermediates for the Preparation of α -Aza-Peptides. *J. Chem. Soc. Perkin. 1.* **1975**, *0* (17), 1712–1720.
- [5] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid Phase Aza Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 3421–3425.
- [6] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (21), 2010–2013.
- [7] Freeman, N. S.; Tal-Gan, Y.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis: Aza Scan of a PKB/Akt Inhibitor Using Aza-Arginine and Aza-Proline Precursors. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3078–3085.
- [8] Truuman, E. Proteiinkinaas A substraadi RASVA asa-analoogide süntees aktivaatoriga COMU. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool 2018.
- [9] Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-Amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7* (6), 864–878.
- [10] McMechen, M. A. Structural Impact of Aza-Amino Acid Substitution in β -Hairpin Model Systems. Magistratöö, North Carolina State University.
- [11] Fauchère, J. L.; Charton, M.; Kier, L. B.; Verloop, A.; Pliska, V. Amino Acid Side Chain Parameters for Correlation Studies in Biology and Pharmacology. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32* (4), 269–278.
- [12] Härk, H. H. Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga trifosgeen. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool 2018.
- [13] Eustache, S.; Leprince, J.; Tufféry, P. Progress with Peptide Scanning to Study Structure-Activity Relationships: The Implications for Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11* (8), 771–784.
- [14] Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (3), 292–296.
- [15] Zega, A.; Urleb, U. Azapeptides. *Acta Chim. Slov.* **2002**, *49*, 649–662.

- [16] Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. Theoretical Study of the Structure and Rotational Flexibility of Diacylhydrazines: Implications for the Structure of Nonsteroidal Ecdysone Agonists and Azapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (39), 9395–9401.
- [17] Dutta, A. S.; Giles, M. B. Polypeptides. Part XIV.1 A Comparative Study of the Stability towards Enzymers of Model Tripeptides Containing Alpha-Aza-Amino-Acids, L-Amino-Acids, and D-Amino-Acids. *J. Chem. Soc. Perkin. 1.* **1976**, *2*, 244–248.
- [18] Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and Their Therapeutic Potential. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (9), 1139–1164.
- [19] Proulx, C.; Picard, É.; Boeglin, D.; Pohankova, P.; Chemtob, S.; Ong, H.; Lubell, W. D. Azapeptide Analogues of the Growth Hormone Releasing Peptide 6 as Cluster of Differentiation 36 Receptor Ligands with Reduced Affinity for the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6502–6511.
- [20] Sabatino, D.; Proulx, C.; Pohankova, P.; Ong, H.; Lubell, W. D. Structure-Activity Relationships of GHRP-6 Azapeptide Ligands of the CD36 Scavenger Receptor by Solid-Phase Submonomer Azapeptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (32), 12493–12506.
- [21] Chingle, R.; Ratni, S.; Claing, A.; Lubell, W. D. Application of Constrained Aza-Valine Analogs for Smac Mimicry. *Pept. Sci.* **2016**, *106* (3), 235–244.
- [22] Wiczerza, E.; Drabik, P.; Łankiewicz, L.; Oldziej, S.; Grzonka, Z.; Abrahamson, M.; Grubb, A.; Brömme, D. Azapeptides Structurally Based upon Inhibitory Sites of Cystatins as Potent and Selective Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4202–4211.
- [23] Verhelst, S. H.; Witte, M. D.; Arastu-Kapur, S.; Fonovic, M.; Bogoy, M. Novel Aza Peptide Inhibitors and Active-Site Probes of Papain-Family Cysteine Proteases. *Chembiochem.* **2006**, *7* (6), 943–950.
- [24] Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2002**, *18* (1), 1–9.
- [25] Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids.* **2018**, *50*, 39–68.
- [26] Fischer, E. Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride Der Aminosäuren Und Ihrer Acylderivate. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 605–619.
- [27] Fischer, E. Synthese von Polypeptiden. XVII. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 1754–1767.
- [28] Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- [29] Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron.* **2005**, *61* (46), 10827–10852.

- [30] Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254.
- [31] James, I. W. Linkers for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 4855–4946.
- [32] Vaino, A. R.; Janda, K. D. Solid-Phase Organic Synthesis: A Critical Understanding of the Resin. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 579–596.
- [33] Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, 1st edition.; Oxford University Press: USA, 2000.
- [34] Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.
- [35] McKay, F. C.; Albertson, N. F. New Amine-Masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (17), 4686–4690.
- [36] Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (19), 5748–5749.
- [37] Rahali, H.; Ghanem, N.; Griffe, L.; Rahali, R.; Stien, D. A General Approach to the Quantification of Resin-Bound Functional Groups by NMR. *New J. Chem.* **2004**, *28*, 1344–1346.
- [38] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [39] Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- [40] Coupling Reagents Offered by Bachem.
- [41] El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
- [42] Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116.
- [43] Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 2447–2467.
- [44] Joullie, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of Amide Bond Formation. *ARKIVOC.* **2010**, *8*, 189–250.
- [45] Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (7), 1541–1556.
- [46] Melton, S. D.; Smith, M. S.; Chenoweth, D. M. Incorporation of Aza-Glycine into Collagen Peptides. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (3), 1706–1711.

- [47] Sabatino, D.; Proulx, C.; Klocek, S.; Bourguet, C. B.; Boeglin, D.; Ong, H.; Lubell, W. D. Exploring Side-Chain Diversity by Submonomer Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2009**, *11* (16), 3650–3653.
- [48] Abo-Dya, N. E.; Biswas, S.; Basak, A.; Avan, I.; Alamry, K. A.; Katritzky, A. R. Benzotriazole-Mediated Synthesis of Aza-Peptides: En Route to an Aza-Leu-enkephalin Analogue. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (8), 3541–3552.
- [49] Melendez, R. E.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of N-Boc-Aza-Dipeptides in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (21), 6759–6764.
- [50] Garcia-Ramos, Y.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Synthesis of Hydrazine and Azapeptide Derivatives by Alkylation of Carbazates and Semicarbazones. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 985–993.
- [51] Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Hölzemann, G.; Kessler, H. Novel Solid-Phase Synthesis of Azapeptides and Azapeptoides via Fmoc-Strategy and Its Application in the Synthesis of RGD-Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (20), 7388–7394.
- [52] Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of Azapeptides by the Fmoc/Tert-Butyl/Polyamide Technique. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* **1993**, *0*, 2843–2849.
- [53] Frochot, C.; Vanderesse, R.; Driou, A.; Linden, G.; Marraud, M.; Cung, M. T. A Solid-Phase Synthesis of Three Aza-, Iminoaza- and Reduced Aza-Peptides From the Same Precursor. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 219–225.
- [54] Hansen, T. K. Synthesis of Azapeptides From Hindered Amines Leading to Novel Growth Hormone Secretagogues. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (51), 9119–9120.
- [55] Venkatraman, S.; Kong, J.-S.; Nimkar, S.; Wang, Q. M.; Aube, J.; Hanzlik, R. P. Design, Synthesis and Evaluation of Azapeptides as Substrates for Human Rhinovirus 3C Protease. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 577–580.
- [56] Andre, F.; Marraud, M.; Tsouloufis, T.; Tzartos, S. J.; Boussard, G. Triphosgene: An Efficient Carbonylating Agent for Liquid and Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. Application to the Synthesis of Two Aza-Analogues of the AChR MIR Decapeptide. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 429–441.
- [57] McMeichen, M. A.; Willis, E. L.; Gourville, P. C.; Proulx, C. Aza-Amino Acids Disrupt β -Sheet Secondary Structures. *Molecules.* **2019**, *24*, 1919–1930.
- [58] Zhou, Y.; Gong, R.; Miao, W. New Method of Synthesizing N-Alkoxycarbonyl-N-arylamide with Triphosgene. *Synth. Commun.* **2006**, *36* (18), 2661–2666.
- [59] Cotarca, L.; Geller, T.; Repasi, J. Bis(Trichloromethyl)Carbonate (BTC, Triphosgene): A Safer Alternative to Phosgene? *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 1439–1446.
- [60] Eckert, H.; Forster, B. Triphosgene, a Crystalline Phosgene Substitute. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26* (9), 894–895.

- [61] Eckert, H. Phosgenation Reactions With Phosgene From Triphosgene. *Chim. Oggi*. **2011**, *29* (6), 40–46.
- [62] Damle, S. B. Safe Handling of Diphosgene, Triphosgene. *CE News*. **1993**, *71* (6), 4.
- [63] Zega, A.; Mlinsek, G.; Sepic, P.; Gradadolnik, S. G.; Solmajer, T.; Tschopp, T. B.; Steiner, B.; Kikelj, D.; Urleb, U. Design and Structure–Activity Relationship of Thrombin Inhibitors with an Azaphenylalanine Scaffold: Potency and Selectivity Enhancements Via P2 Optimization. *Biorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2745–2756.
- [64] Betts, M. J.; Russell, R. B. *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*. In *Bioinformatics for Geneticists*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2003; p 309.
- [65] Bourguet, C. B.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Benzophenone Semicarbazone Protection Strategy for Synthesis of Aza-Glycine Containing Aza-Peptides. *Biopolymers*. **2008**, *90* (6), 824–831.
- [66] Singh, S.; Shrivastava, R.; Singh, G.; Ali, R.; Ampapathi, R. S.; Bhadhuria, S.; Haq, W. AzaGly-Appended Peptidomimetics Structurally Related to PTR6154 as Potential PKB/Akt Inhibitors. *Chembiochem*. **2017**, *18* (12), 1061–1065.
- [67] Chingle, R.; Mulumba, M.; Chung, N. N.; Nguyen, T. M.-D.; Ong, H.; Ballet, S.; Schiller, P. W.; Lubell, W. D. Solid-Phase Azopeptide Diels–Alder Chemistry for Aza-Pipecolyl Residue Synthesis To Study Peptide Conformation. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (10), 6006–6016.
- [68] Ogura, H.; Kobayashi, T.; Shimizu, K.; Kawabe, K.; Takeda, K. A Novel Active Ester Synthesis Reagent (N,N'-Disuccinimidyl Carbonate). *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (49), 4745–4746.
- [69] Solid Phase Peptide Synthesis by Fmoc-Chemistry: Manual for the Laboratory Course Winter-Spring. Koostatud TÜ Tehnoloogiainstituudis, Prof Ü. Langeli teadusgrupi poolt (2014).
- [70] Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, T.; Gilon, C. In Situ Generation of Fmoc-Amino Acid Chlorides Using Bis- (Trichloromethyl)Carbonate and Its Utilization for Difficult Couplings in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Res.* **1999**, *53* (5), 507–517.
- [71] Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G. Triphosgene As Highly Efficient Reagent for the Solid-Phase Coupling of N-Alkylated Amino Acids—Total Synthesis of Cyclosporin O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5013–5016.
- [72] Chantell, C. A.; Onaiyekan, M. A.; Menakuru, M. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Comparative Study of Different Activators. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (2), 88–91.

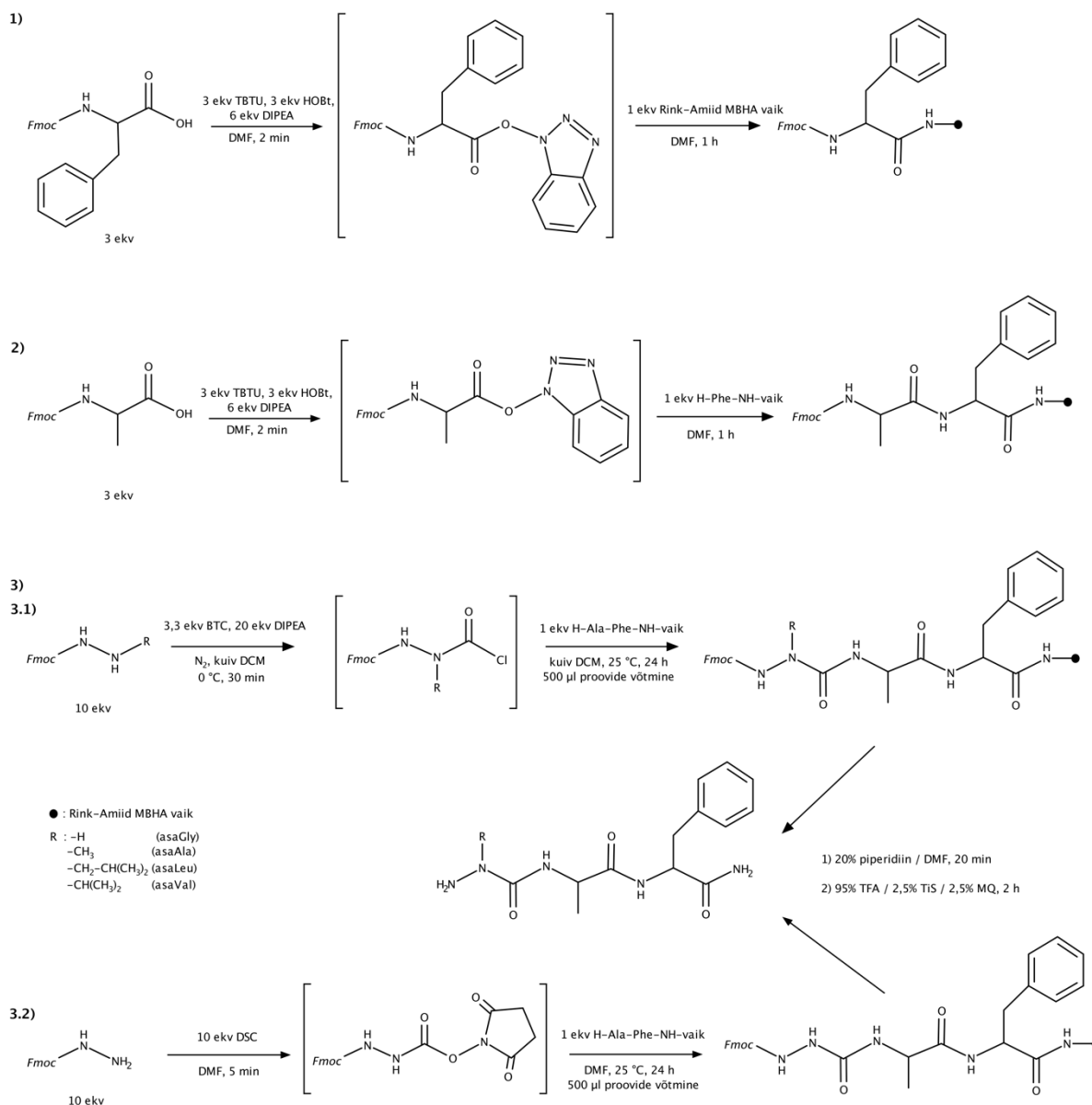
Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada oma juhendajat, dr Anu Ploomi, kes oli toeks ja abiks käesoleva magistritöö valmimisele nii hea nõu kui ka sõnaga. Samuti avaldatakse tänu dr Anton Mastitski teadusgrupile ja Alla Troskale (MSc) tööks vajalike asa-aminohapete prekursorite sünteesimise eest.

Autor soovib tänada ka oma perekonda igakülgse toetuse ja mõistmise eest ning toredaid kolleege orgaanilise keemia õppetoolist.

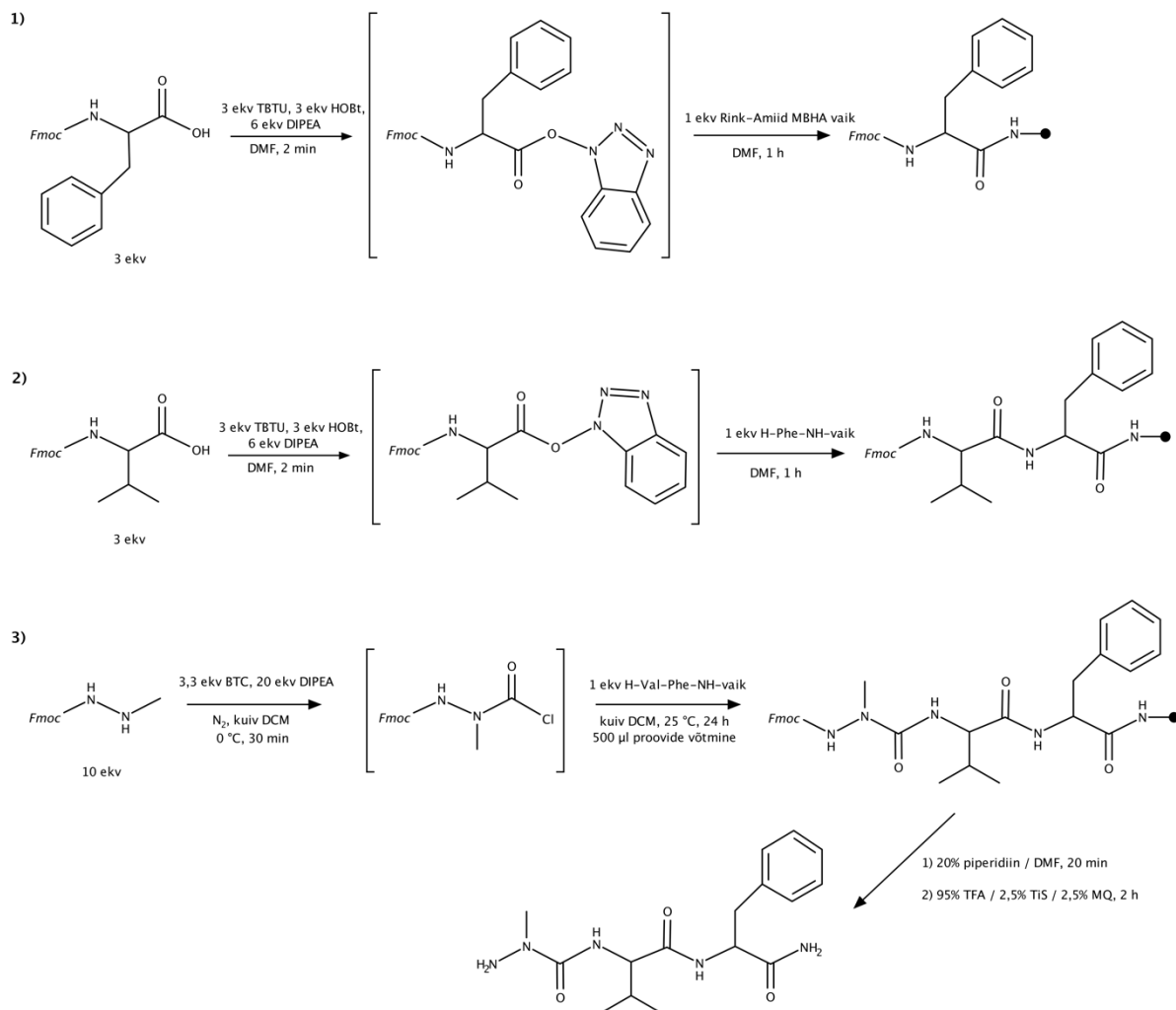
Lisad

Lisa 1. Mudel asa-tripeptiidi H-asaAH-Ala-Phe-NH₂ süntees. 1) Fmoc-Phe sidumine tahkele kandjale TBTU-ga; 2) Fmoc-Ala sidumine järjestusele H-Phe-NH-vaik TBTU-ga; 3) Dipeptiidile H-Ala-Phe-NH-vaik 3.1) Fmoc-asaAH sidumine BTC-ga; 3.2) Fmoc-asaGly sidumine DSC-ga.

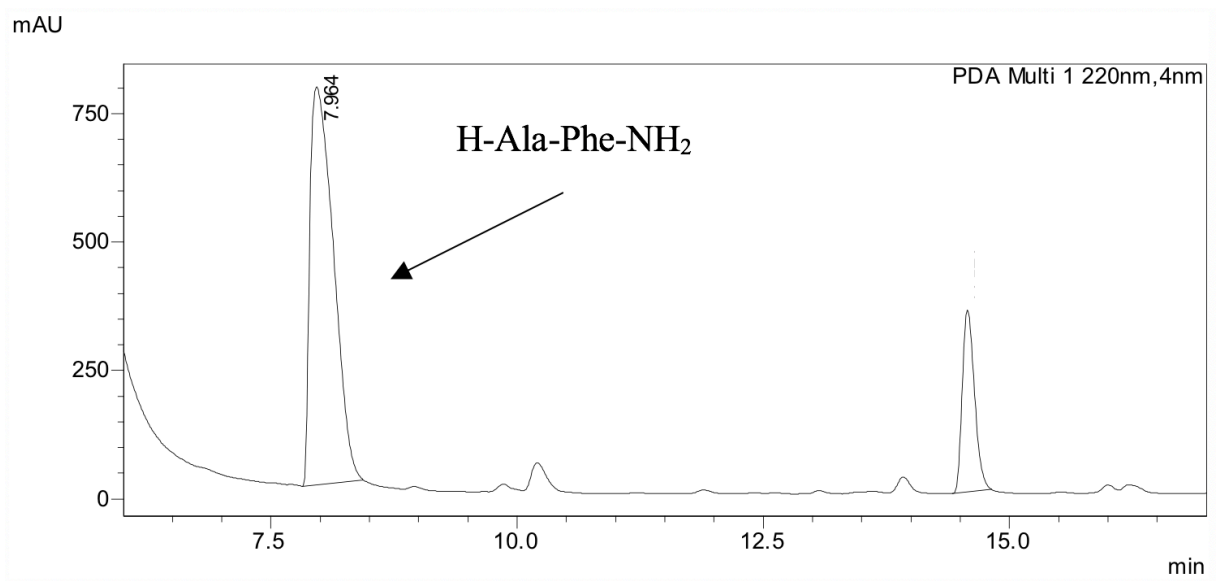


Lisa 2. Mudel asa-tripeptiidi H-asaAla-Val-Phe-NH₂ süntees, kus • tähistab tahket kandjat.

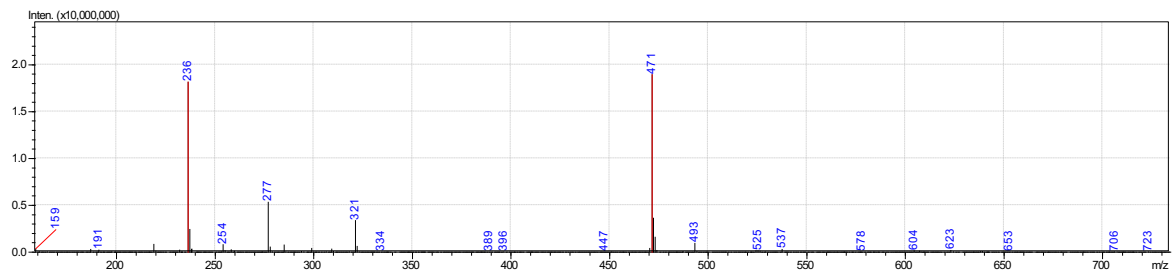
1) Fmoc-Phe sidumine tahkele kandjale TBTU-ga; 2) Fmoc-Val sidumine järjestusele H-Phe-NH-vaik TBTU-ga; 3) Fmoc-asaAla sidumine dipeptiidile H-Val-Phe-NH-vaik BTC-ga.



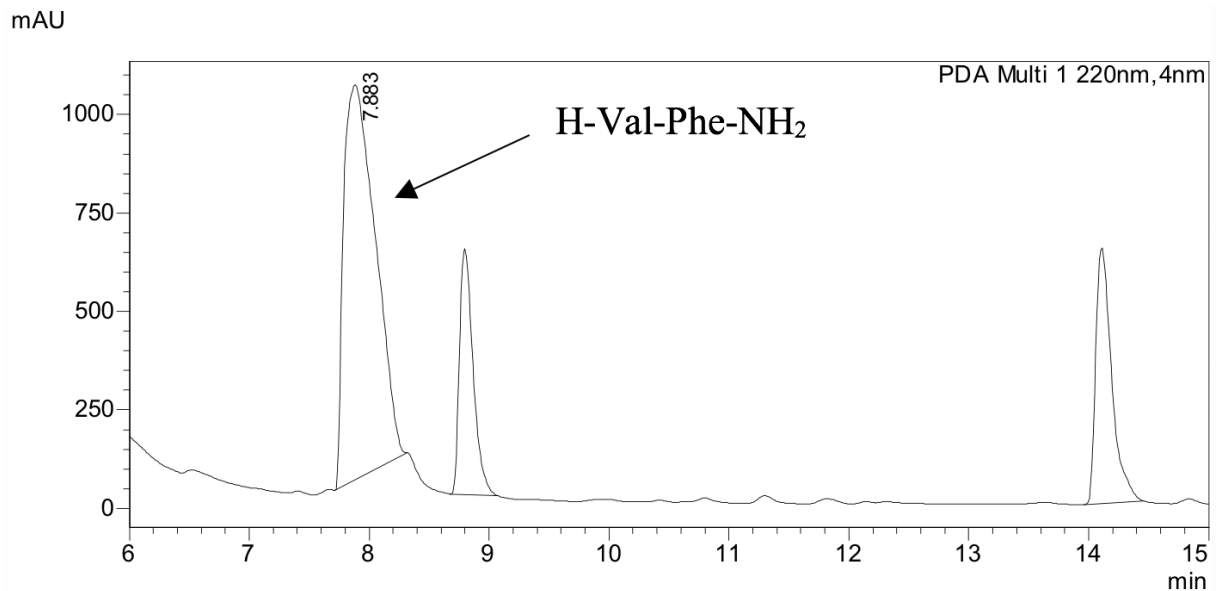
Lisa 3. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm.



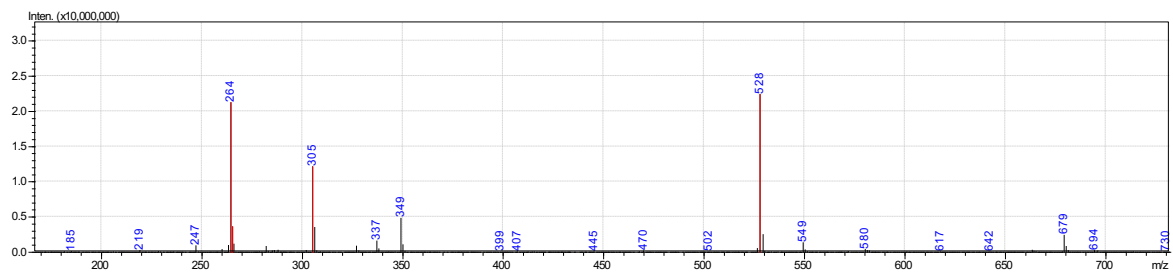
Lisa 4. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ massispekter: [M+H]⁺; [2M+H]⁺



Lisa 5. Lähtepeptiidi H-Val-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm.



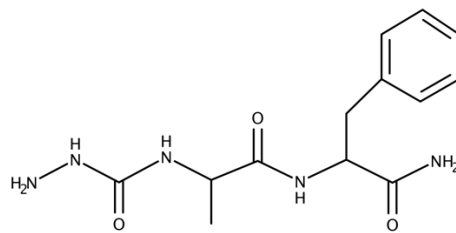
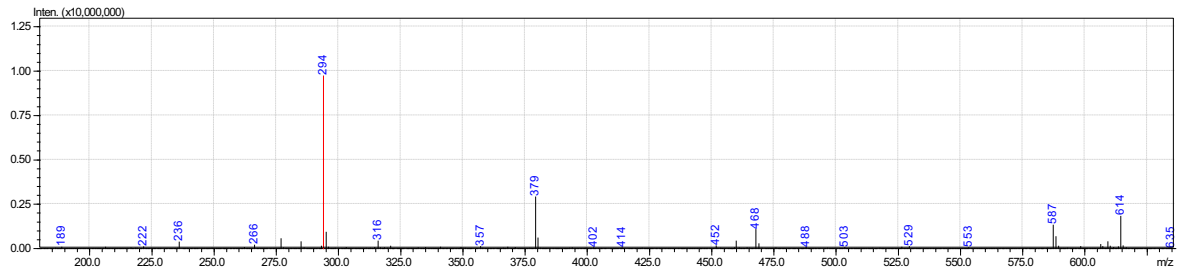
Lisa 6. Lähtepeptiidi H-Val-Phe-NH₂ massispekter: [M+H]⁺; [M+ACN+H]⁺; [2M+2H]²⁺



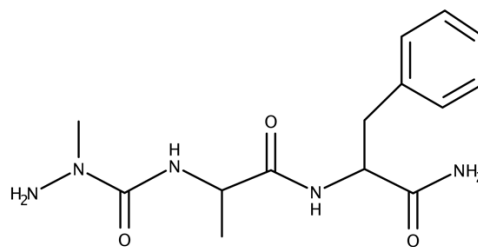
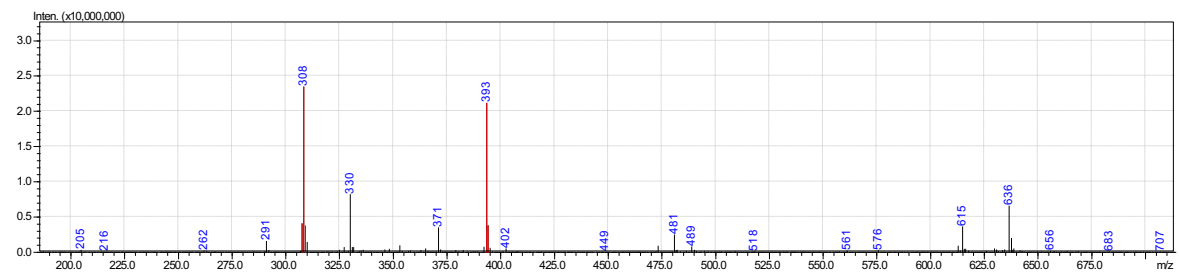
Lisades 3 – 6 on visualiseeritud lähtepeptiidide H-Ala-Phe-NH₂ ja H-Val-Phe-NH₂ HPLC kromatogrammid ja massispektrid positiivse ionisatsiooni režiimis, mis on saadud peatükis 3.2.1 kirjeldatud eeskirja alusel valmis sünteesitud dipeptiidide manuaalsel sisestamisel HPLC-MS-i.

Lisa 7. Peatükis 3.2.2 toodud eeskirja alusel sünteesitud asa-tripeptiidide struktuurid ja massispektrid positiivse ionisatsiooni režiimis.

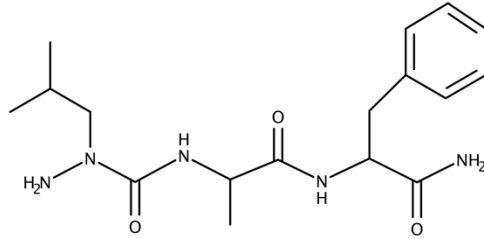
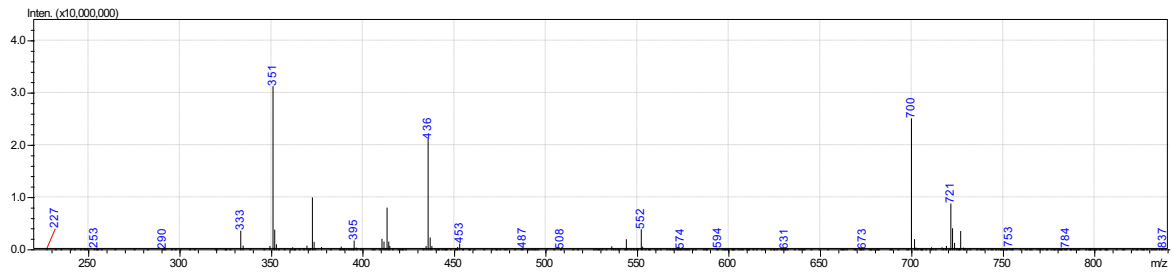
H-asaGly-Ala-Phe-NH₂ massispekter: [M+H]⁺



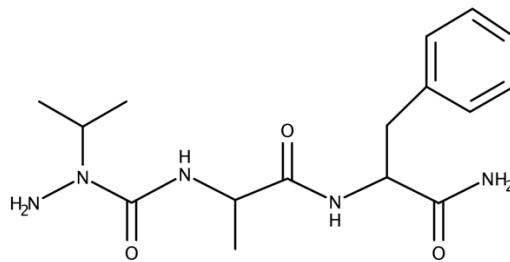
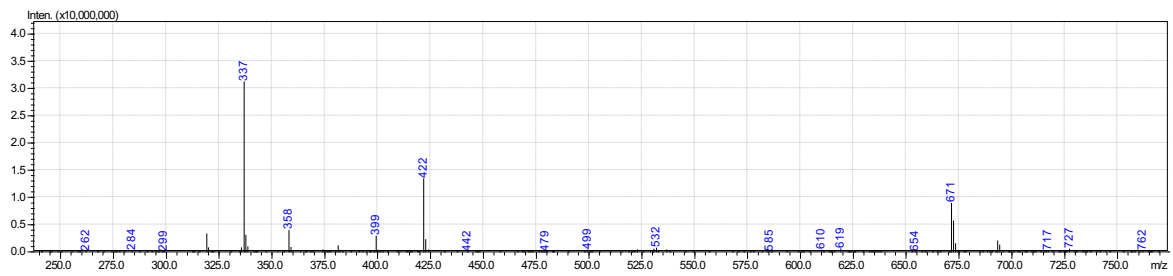
H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ massispekter: [M+H]⁺ ; [M+2ACN+4H]⁴⁺



H-asaLeu-Ala-Phe-NH₂ massispekter: [M+2H]²⁺ ; [M+2ACN+4H]⁴⁺ ; [2M+2H]²⁺

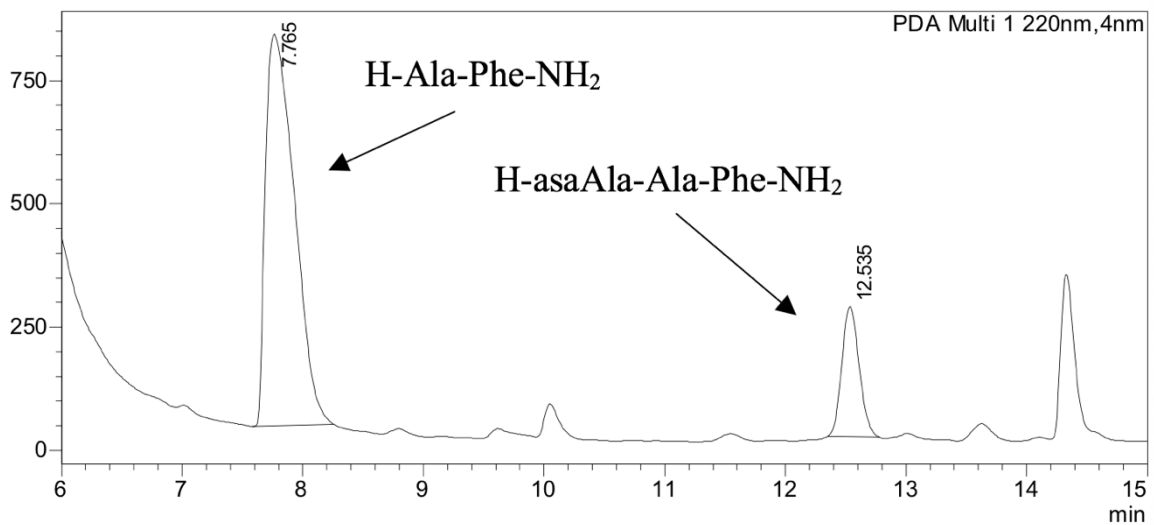


H-asaVal-Ala-Phe-NH₂ massispekter: [M+2H]²⁺ ; [M+2ACN+4H]⁴⁺ ; [2M+H]⁺



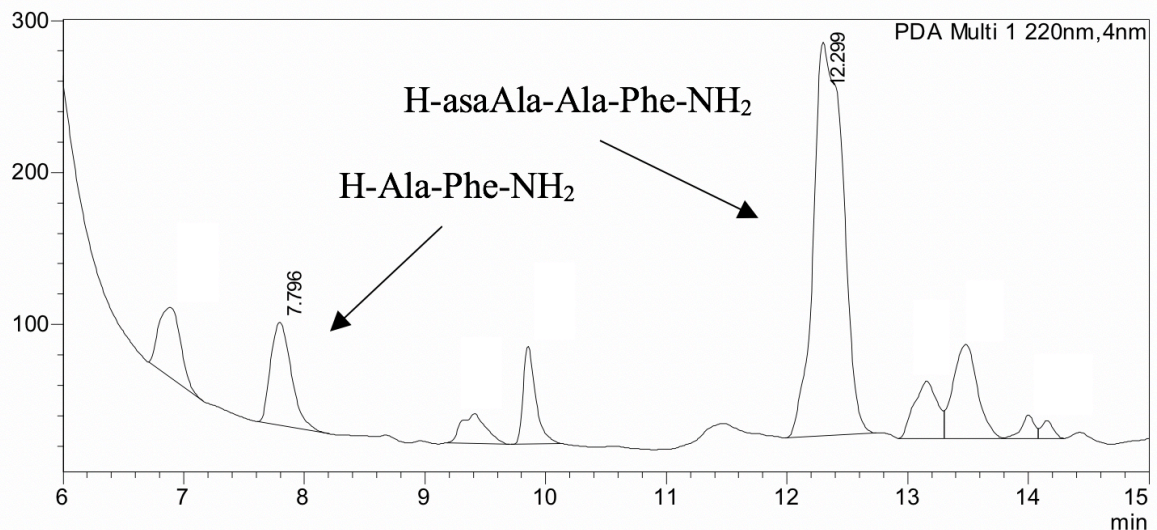
Lisa 8. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ ja produkti H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm eeskirja 3.2.2.1.1 alusel aktiveeritud asaAla dipeptiidile sidumise 15. minutil.

mAU

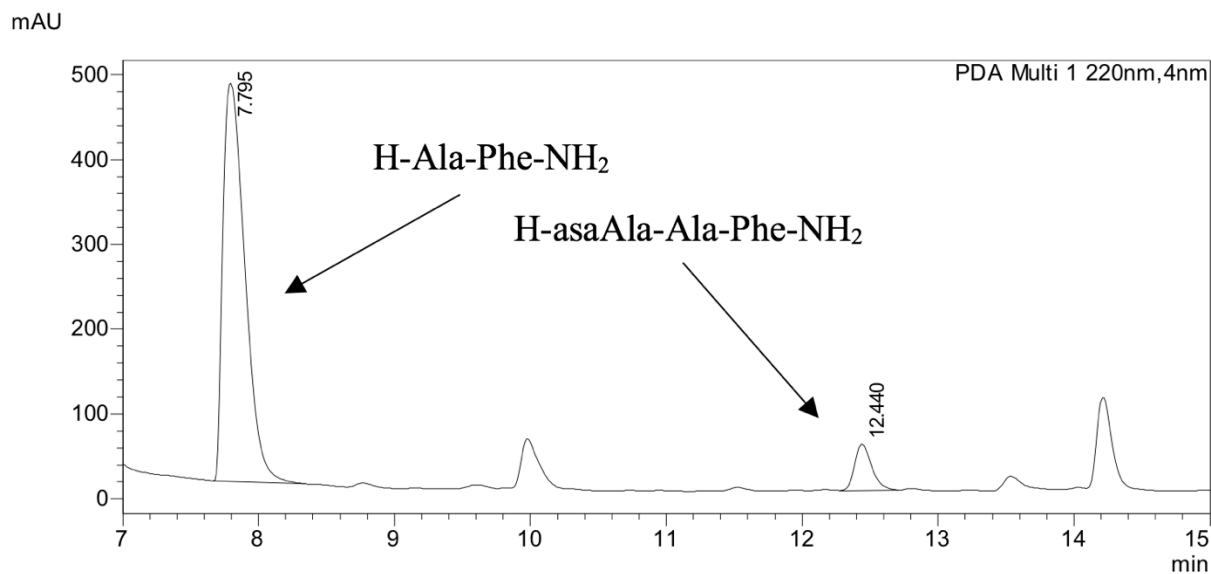


Lisa 9. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ ja produkti H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm eeskirja 3.2.2.1.1 alusel aktiveeritud asaAla dipeptiidile sidumise 24 h punktis.

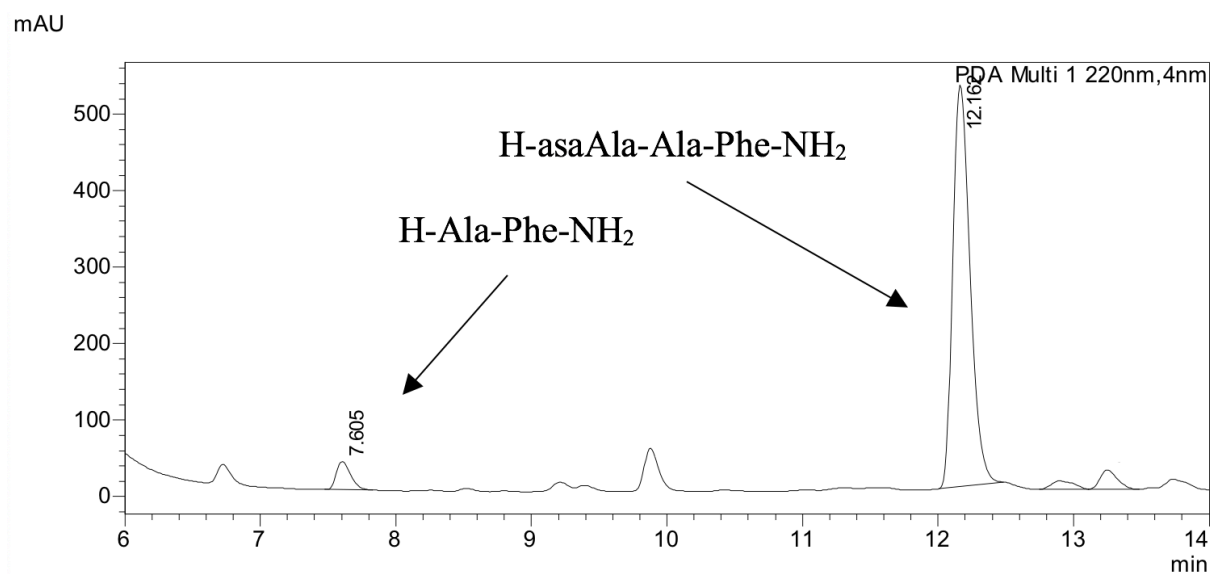
mAU



Lisa 10. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ ja produkti H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm eeskirja 3.2.2.1 alusel aktiveeritud asaAla dipeptiidile sidumise 15. minutil.

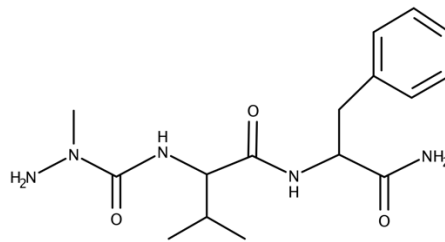
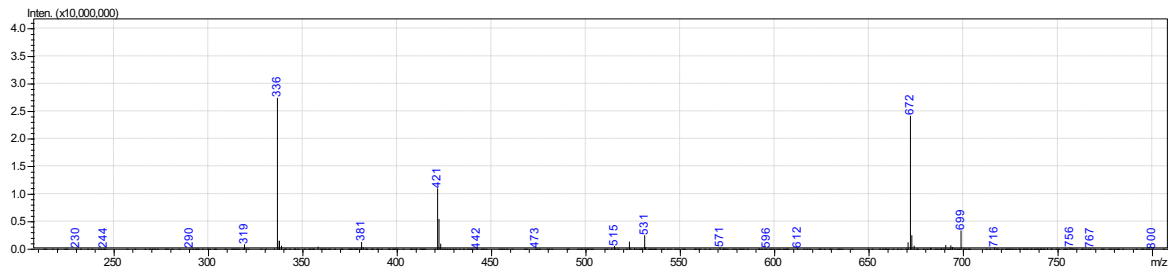


Lisa 11. Lähtepeptiidi H-Ala-Phe-NH₂ ja produkti H-asaAla-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm eeskirja 3.2.2.1 alusel aktiveeritud asaAla dipeptiidile sidumise 24 h punktis.



Kromatogrammidel **Lisa 8 – Lisa 11** on näha produkti (asa-tripeptiidi) piigi kasv ajas kahe erineva katse korral võttes proove reaktsioonisegust, kus toimus asaAla sidumine lähtepeptiidile H-Ala-Phe-NH₂-vaik. Proovid lahustati 5% ACN/H₂O lahuses ning sisestati manuaalselt kogusena 40 µl. Proovide analüüsimiseks kasutati gradientprogrammi, kus puhver B (0,1% TFA ACN-is) sisaldus kasvas ajas (puhver A 0,1% TFA H₂O-s), kusjuures voolukiirus oli 1 ml/min. Ühendid detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

Lisa 12. Peatükis 3.2.4 toodud eeskirja alusel sünteesitud asa-peptiidi H-asaAla-Val-Phe-NH₂ struktuur ja massispekter positiivse ionisatsiooni režiimis: [M+H]⁺ ; [M+2ACN+4H]⁴⁺ ; [2M+2H]²⁺



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Heleri Heike Härk,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Asa-aminohappe struktuuri mõju asa-peptiidi sünteesile kasutades aktivaatorit trifosgeen“,
mille juhendaja on Anu Ploom (PhD),

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 02.06.22 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Heleri Heike Härk

26.05.2020