

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
Keemia instituut

Heleri Heike Härk

# Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga trifosgeen

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: Anu Ploom, PhD

Meeli Arujõe, MSc

Tartu 2018

## Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga trifosgeen

Peptiidid on head ravimikandidaadid, kuid nende kasutamine ravimitena on piiratud kiire lagunemise tõttu elusorganismides. Seega on arendatud peptidomimeetikuid, nt asa-peptiide, mis oleksid ensümaatilisele degradatsioonile vastupidavamad. Asa-peptiidide bioaktiivseid omadusi on aga vähe uuritud, kuna nende sünteesimiseks puuduvad sobilikud meetodid.

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata kineetilise meetodiga aktivaatori trifosgeen efektiivsust asa-peptiidsideme sünteesil mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub>. Selgus, et asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioon ei lähe lõpuni ja on aeglane ning võrreldes teiste asa-peptiidsünteesis kasutatud aktivaatoritega, on reaktsiooni saagis madal. Seega tuleks efektiivsemaks asa-peptiidide sünteesimeetodi välja töötamiseks testida veel tahkefaasilisel peptiidsünteesil kasutatud sidumisreagente või arendada sootuks uusi aktivaatoreid.

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

P390 – Orgaaniline keemia

### Formation of aza-peptide bond using triphosgene as an activator

Peptides are potential drug candidates, but their usage is limited due to their rapid degradation in living organisms. Hence, peptidomimetics, including aza-peptides, have been developed to increase duration towards enzymatic decomposition. However, the extensive study of aza-peptides bioactive properties is restricted due to the lack of suitable synthesis methods of them.

The aim of this research was to evaluate efficiency of triphosgene as a coupling reagent on synthesis of aza-peptides. Kinetic measurements were performed to examine coupling of amino acid to the aza-amino acid residue in model peptide H-Ala-azaAla-Phe-NH<sub>2</sub>. As a result, the formation of aza-peptide bond is incomplete and slow. Furthermore, the reaction yield is low compared to other coupling reagents tested in aza-peptide synthesis. In conclusion, it is necessary to examine other commercial solid-phase peptide synthesis coupling reagents or develop new ones in order to elaborate effective aza-peptide synthesis protocol.

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

P390 – Organic chemistry

# Sisukord

Töös kasutatud lühendid.....	4
1. Sissejuhatus .....	6
2. Kirjanduse ülevaade .....	7
2.1 Peptiidid ja asa-peptiidid.....	7
2.2 Tahkefaasiline peptiidsüntees (SPPS) .....	8
2.2.1. Kaitserühmad .....	9
2.2.2 Aktivaatorid.....	10
2.3 Tahkefaasiline asa-peptiidsüntees .....	13
2.3.1 Asa-aminohappejäägi prekursori peptiidjärjestusse lisamine .....	13
2.3.2 Trifosgeen asa-peptiidsünteesi aktivaatorina .....	14
2.3.3 Asa-peptiidsideme süntees .....	16
3. Eksperimentaalne osa .....	17
3.1 Reaktiivid, töövahendid ja aparatuur .....	17
3.2 Sünteeside kirjeldused.....	18
3.2.1 Fmoc-Phe-NH-vaik süntees .....	18
3.2.2 Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik süntees .....	19
3.2.3 Mudel asa-peptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH <sub>2</sub> asa-peptiidsideme moodustumise kineetilised mõõtmised.....	20
4. Tulemused ja arutelu .....	22
5. Kokkuvõte .....	27
Summary .....	28
Kasutatud kirjandus.....	29
Tänuavaldused.....	33
Lisad .....	34

## Töös kasutatud lühendid

Lühend	Inglisekeelne nimetus	Eestikeelne nimetus
Ala	Alanine	Alaniin
Boc	Butyloxycarbonyl	Butüüloksükarbonüül
Bzl	Benzyl	Bensüül
BTC	Bis(trichloromethyl)carbonate	Bis(triklorometüül)karbonaat
COMU	1-((1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)-dimethylamino-morpholinomethylene))methanaminium hexafluorophosphate	1-((1-(Tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülideenaminooksü)-dimetüülamino-morfolinometüleen))metaanamiinium heksafluorofosfaat
DCM	Dichloromethane	Diklorometaan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide	N,N'-Diisopropüülkarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine	N,N-Diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-Dimethylformamide	N,N-Dimetüülformamiid
Et <sub>2</sub> O	Diethylether	Dietüüleeter
EtOH	Ethanol	Etanool
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	9-Fluorenüülmetoksükarbonüül
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	O-(7-Asabensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	O-(Bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HCl	Hydrogen chloride	Vesinikkloriid
HCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	O-(1H-6-Klorobensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HDMC	6-chloro-1-((dimethylamino)(morpholino)methylene)-1H-benzotriazolium hexafluorophosphate-3-oxide	6-kloro-1-((dimetüülamino)(morfolino)-metüleen)-1H-bensotriasoolium heksafluorofosfaat-3-oksiid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	1-Hüdroksübensotriasool

HPLC-MS	High-performance liquid chromatography - mass spectrometry	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia - massispektromeetria
KCN	Potassium cyanide	Kaaliumtsüaniid
KT	Kaiser's test	Kaiseri test
MBHA	4-Methylbenzhydrylamine	4-Metüülbensüülhüdrüülamiin
NMM	N-Methylmaleimide	N-Metüülmaleiinimiid
Phe	Phenylalanine	Fenüülalaniin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate	Bensotriasool-1-üüloksütri(pürrolidino) fosfoonium heksafluorofosfaat
PyOxim	O-((Cyano(ethoxycarbonyl)methylidene)-amino)-yloxytri(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate	O-((Tsüano(etoksükarbonüül)metüülideen)-amino)-üüloksütri(pürrolidino) fosfoonium heksafluorofosfaat
SPPS	Solid-phase peptide synthesis	Tahkefaasiline peptiidisüntees
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate	O-(Bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat
<i>tert</i> -but	Tertiary butyl	<i>tert</i> -butüül
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroetaanhape
THF	Tetrahydrofurane	Tetrahüdrofuraan
TiS	Triisopropylsilane	Triisopropüülsilaan
TLC	Thin-layer chromatography	Õhukese kihi kromatograafia
TMR	Nuclear magnetic resonance	Tuumamagnetresonants
UV-kiirgus	Ultraviolet radiation	Ultraviolettkiirgus

# 1. Sissejuhatus

Peptiididel on elusorganismides mitmeid funktsioone, mistõttu peetakse neid potentsiaalseteks ravimikandidaatideks. Nende puuduseks on aga kiire ensümaatiline degradatsioon biosüsteemides. Seega luuakse peptiidsidemete modifitseerimise teel peptidomimeetikuid, mis oleksid organismides vastupidavamad, säilitades originaalpeptiidide head omadused [1]. Üheks võimaluseks muuta peptiidi struktuuri on ühes või mitmes aminohappejäägis  $\alpha$ -CH rühma asendamine lämmastikuga, mille tulemiks on asa-peptiidid [2]. Asa-peptiidide bioaktiivsete omaduste uurimist on aga seni takistanud sobiva sünteesimeetodi puudumine.

Hiljuti on meie teadusgrupis välja töötatud kineetiline meetod, mis võimaldab jälgida peptiidsideme tekkimist. Kasutades asa-peptiidsideme moodustumisel tahkefaasilise peptiidsünteesi aktivaatoreid ning võrreldes tulemusi tavapeptiidsideme tekkega ilmnes, et tahkefaasilise peptiidsünteesi protokollis otsene rakendamine asa-peptiidsideme sünteesiks ei anna tõhusaid tulemusi. Selgus, et asa-peptiidsideme sünteesi efektiivsus sõltub aktivaatori struktuurist [3], millest järeldati, et asa-peptiidide sünteesiks on tarvis tõhusamaid aktivaatoreid. Sobiva aktivaatori leidmiseks on üheks võimaluseks testida veel kommertsiaalseid ning tavapeptiidsünteesil kasutatavaid aktivaatoreid, mis võimaldaksid asa-aminohappe hüdrasino-terminaalse otsa efektiivsemat atsüülimist.

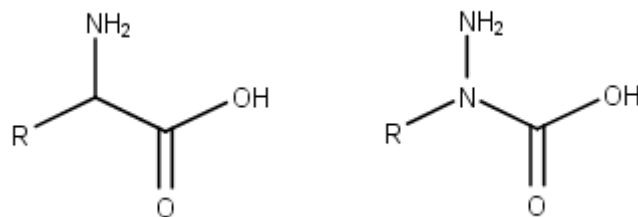
Käesoleva töö eesmärgiks on uurida kineetiliselt mudelpeptiidsideme moodustumist kasutades aktivaatorina trifosgeeni (BTC). Seda aktivaatorit on kasutatud nii keerulisemate peptiidijärjestuste kui ka asa-peptiidide sünteesimiseks [2–6], aga asa-peptiidsideme teket BTC-ga pole siiani veel kineetiliselt uuritud. Antud töö tulemused võimaldaksid hinnata BTC efektiivsust asa-peptiidsideme sünteesil ning sobivuse korral aitaksid kaasa sünteesimeetodi optimeerimisele.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Peptiidid ja asa-peptiidid

Peptiidid koosnevad omavahel amiidsidemetega ühendatud aminohapetest [7]. Looduses on neil tähtis roll - esinedes igas elavas organismis, osalevad peptiidid paljudes füsioloogilistes ja bioloogilistes protsessides transportides biomolekule läbi membraani, osaledes rakusiseses kommunikatsioonis ning kaitstes organismi antikehadena [8]. Tänu nende mitmete funktsioonidele elusorganismides peetakse neid potentsiaalseteks ravimikandidaatideks. Peptiidide rakendamine medikamentidena on aga raskendatud - peamisteks probleemideks on nende lagunemine ensüümide tõttu, komplitseeritud transport rakku membraanide läbimise tõttu ning ebapiisav selektiivsus retseptoritega seondumisel [4]. Seetõttu on hakatud arendama ühendeid – peptidomimeetikuid – mis imiteeriksid peptiidide häid omadusi, samas oleksid organismis püsivamad [1].

Üks peptidomimeetikute saamise võimalusi on  $\alpha$ -süsiniku aatomi asendamine lämmastiku aatomiga ühes või mitmes peptiidijärjestusse kuuluvas aminohappes. Selliseid ühendeid nimetatakse asa-peptiidideks (Skeem 1) [5]. Süsiniku aatomi vahetamine lämmastiku aatomiga vastu muudab peptiidi bioloogilisi ja keemilisi omadusi kuna pöörlev peptiidside  $C_{\alpha}$ -C(O) asendub jäiga  $N_{\alpha}$ -C(O) sidemega [1]. Lisaks toob selline asendus kaasa kiraalsuse elimineerimise  $\alpha$ -positsioonis ja geomeetrilise muutuse tetraeedrilisest trigonaalseks, mistõttu väheneb karbonüülrühma elektrofiilsus [1].  $C_{\alpha}$ -aatomi asendamine lämmastikuga võimaldab luua pseudopeptiide, säilitades originaalpeptiidi kõrvalrühmi [2].



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

Tänu asa-peptiidide muutunud konformatsioonile on nad vastupidavamad ka ensümaatilisele lagundamisele, mis teeb neist head ravimikandidaadid [1]. Nende bioaktiivsete omaduste

laiaulatuslikku uurimist piirab aga sobivate sünteesimeetodite puudumine, mistõttu on asapeptiide siiani pigem vähe uuritud [4–6, 9–12].

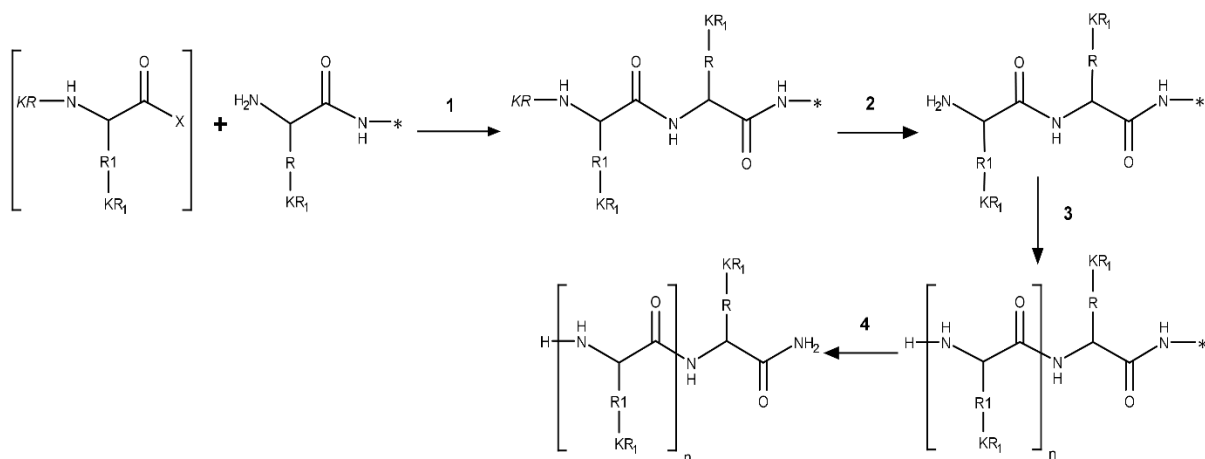
## 2.2 Tahkefaasiline peptiidisüntees (SPPS)

Looduses moodustuvad amiidsidemed  $\alpha$ -aminohapete või peptiidide vahel väga keeruliste jadamisi toimuvate sünteesireaktsioonide kaudu, mis tagab proteiinidele iseloomulikud ja kindla funktsiooniga järjestused. *In vivo* moodustub peptiidside läbi aktiveeritud vaheühendi: seotav aminohape muudetakse aminoestriks ning seda protsessi katalüüsivad mitmed ensüümid [13].

Peptiidide saamiseks sünteetiliselt kasutatakse peamiselt kahte lähenemist: peptiidisüntees tahkel kandjal või peptiidisüntees lahuses. Mõlemad peptiidisünteesi meetodid tuginevad üldjoontes samadele põhimõtetele, nende peamine erinevus seisneb esimese aminohappe karboksüülrühma kaitserühma olemuses. Kui selleks on tahke vaak, on tegemist tahkefaasilise peptiidisünteesiga. Kui aga karboksüülrühma kaitsev rühm on reaktsioonikeskkonnas lahustuv, on tegemist peptiidisünteesiga lahuses [8].

Tahket faasi hõlmavad meetodid on välja arendatud peptiidisünteesi hõlbustamiseks. Neist levinuim on klassikaline tahkefaasiline peptiidisüntees, mis põhineb esimese aminohappejäägi, mille N-terminaalne ots on kaitstud, kinnitamisel vaigule, mis on tahkeks kandjaks [8,13,14]. Vaiguks on üldjuhul polümeerne ühend, mis ei tohi lahustuda üheski sünteesis kasutatavatest solventidest. Vaigu külge on püsivalt, kovalentse sideme kaudu, kinnitatud vahelüli, mis võimaldab esimese aminohappejäägi ajutist sidumist tahkele kandjale. Selleks kasutatakse siduvaid reaktiive, mida lisatakse suures ülehulgas, et saavutada maksimaalne sünteesisaagis. Tahkefaasilise peptiidisünteesi eeliseks on selle mugavus: kuna ahel on kinnitatud lahustumatu osa külge, siis on võimalik sünteesilahuses lahustuvad jäägid (näiteks reagentide ülejäägid ning kõrvalsaadused) protsessi käigus välja filtreerida [14]. Kui esimene aminohape on vaigu külge kinnitunud, eemaldatakse kaitserühm ning lisatakse ahelasse järgmine aminohape (Skeem 2, 1), millelt eemaldatakse samuti kaitserühm (Skeem 2, 2). Sidumise ning kaitserühma eemaldamise protsesse vaheldumisi korrates on võimalik sünteesida pika ahela ning soovitud aminohappelise järjestusega peptiid (Skeem 2, 3) [8,13]. Tahkefaasilise peptiidisünteesi käigus sünteesitakse peptiidijärjestus C-terminaalsest otsast N-terminaalse otsani [14]. Viimaks eemaldatakse peptiid tahkelt kandjalt (Skeem 2, 4) [13].





**Skeem 2.** Tahkefaasiline peptidisüntees. R ja R<sub>1</sub> on aminohapete kõrvalahelad, KR tähistab peaahele aminorühma kaitserühma, KR<sub>1</sub> märgib külgrühmade kaitserühmi, X on ahelale lisatava aminohappe aktiveeritud karboksüterminaalne ots ning \* kirjeldab tahket kandjat.

Lahuses toimuva peptidisünteesi korral tuleb peptiid keskkonnast eraldada ning määrata selle järjestus pärast iga aminohappejäagi ahelasse lisamist [8]. Samuti väheneb peptiidi lahustuvus aminohappejäakide arvu kasvamisel ahelas ning muutub probleemseks peptiidi puhastamine [14]. Tahkefaasilise peptidisünteesi korral eelnimetatud probleeme ei esine, mistõttu on see mugavam ja kiirem meetod [8].

### 2.2.1. Kaitserühmad

#### C-terminaalsed kaitserühmad ehk tahked kandjad

Tahkefaasilise peptidisünteesi esimeseks etapiks on soovitud aminohappejäagi sidumine tahkele kandjale [13]. Polümeersete tahkete kandjate korral toimub peptidisüntees vaigu pundunud võrgustiku sees kuna enamik kinnituskohti asuvad just seal. Pundumise tulemusena paigutuvad lahusti molekulid tahke kandja ahelate vahele, tekitades nõnda rohkem ruumi. Tänu sellele pääsevad sidumisreaktsiooniks vajalikud reagentid paremini tahkele kandjale kinnitunud aminohappejäakidele ligi ning sünteesiprotsess toimub kiiremini ja kõrgema efektiivsusega. Pundumiseks kasutatakse aprotoonseid solvente, näiteks diklorometaan (DCM), N,N-dimetüülformamiid (DMF) ja tetrahüdrofuraan (THF) [8].

Sõltuvalt sünteesil kasutatavate reagentide ja kaitserühmade olemusest, eemaldatakse peptiid tahkelt kandjalt erinevate ühenditega. Näiteks hüdroksübensüül- ning tritüülpõhistelt vaikudelt eemaldatakse peptiid happelises keskkonnas kasutades trifluoroetaanhapet (TFA) [13,15].

### N-terminaalsed kaitserühmad

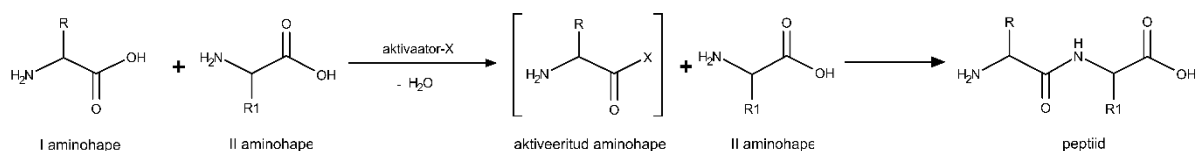
Ennetamaks aminohappe kõrvalahelate ja N-terminaalse rühma osalust peptiidside moodustumises ning muude võimalike kõrvalreaktsioonide vältimiseks, kasutatakse peptiidisünteesis kaitserühmi [13]. Põhiliselt kasutatakse Boc/Bzl või Fmoc/*tert*-but ortogonaalsete kaitserühmade strateegiaid [8].

Boc/Bzl meetodi korral on  $\alpha$ -aminorühma kaitserühmaks *tert*-butüüloksükarbonüül (Boc), mis on stabiilne tugevate leeliste ning katalüütilise hüdrogeenimise suhtes, mistõttu eemaldatakse see iga sidumisreaktsiooni järel happelises keskkonnas kasutades näiteks TFA-d. Kõrvalrühmi kaitsvad bensüülrühmad (Bzl) on püsivamad ning TFA-d kasutades ei eemaldu. Nende eemaldamiseks on vaja tugevamat hapet, näiteks HF, mida rakendatakse peptiidisünteesi lõppedes lisaks ka peptiidi tahkelt kandjalt eemaldamiseks [8].

Fmoc/*tert*-but strateegiat kasutades kaitseb  $\alpha$ -aminorühma 9-fluorometoksüülkarbonüül (Fmoc), mille eemaldamiseks on vajalik mõõdukalt aluseline keskkond, mis tekitatakse näiteks piperidiiniga. Kõrvalrühmi kaitsvate *tert*-butüülrühmade eemaldamiseks vajalik happeline keskkond tekitatakse näiteks TFA-d sisaldavat lahust kasutades, mis lõikab samaaegselt ka peptiidi tahkelt kandjalt [8].

### 2.2.2 Aktivaatorid

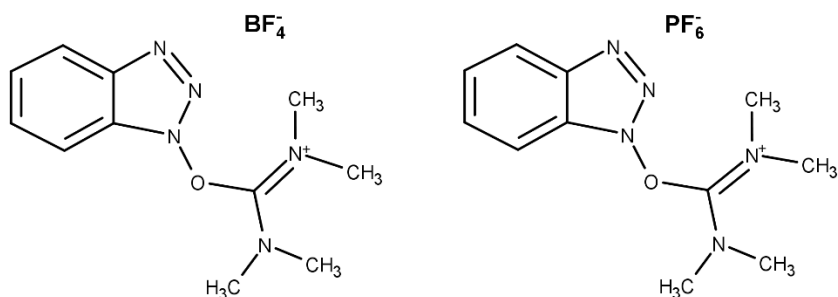
Peptiidide sidumisreagente ehk aktivaatoreid kasutatakse peptiidisünteesil aminohappe karboksüülrühma aktiveerimiseks. Aktiveeritud vaheühend seotakse seejärel teise aminohappejäägi vabale N-terminaalsele otsale moodustades peptiidi (Skeem 3) [16], kusjuures vaba aminorühm on atakeerivaks nukleofiiliks [17].



**Skeem 3.** Peptiidideme moodustumine aktivaatori abil, kus R ja R1 on kõrvalrühmad ning X on aktivaatori lahkv rühm, mis tekitab aktiveeritud oleku seondudes aminohappe C-terminaalse rühmaga.

Karboksüülühenditest on sõltuvalt kasutatavast aktivaatorist võimalik moodustada mitmeid aktiveeritud vaheühendeid nagu atsüülhaliide, atsüülasiide, atsüülimidasoole, anhüdriide ja estreid [13].

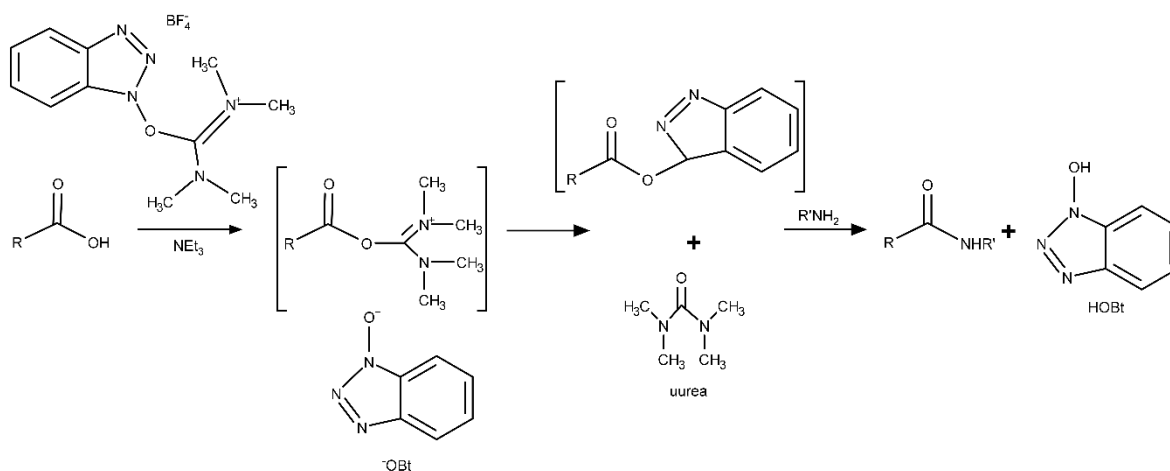
Tahkefaasilisel peptiidisünteesil sõltub aminohappe sidumise efektiivsus enamasti aktivaatori valikust [18]. Reaktsioonide korral, kus aktivaatori ligipääs aminohappe karboksüülrühmale on mingil moel takistatud, kasutatakse siduvate reagentidena laialdaselt urooniumi sooli, näiteks HBTU ja TBTU (Skeem 4). Urooniumil põhinevaid aktivaatoreid ei saa aga lisada otse reaktsioonisegusse, sest tahkele kandjale seotud aminohappejäägi vaba aminorühmaga reageerides moodustub guanidiinrühm, tekitades poolikuid peptiide. Seega on järjestusse lisatava aminohappe karboksüülrühma aktiveerimiseks vajalik eelaktivatsioon väljaspool reaktsioonisegu [8].



**Skeem 4.** TBTU (vasakul) ja HBTU (paremal).

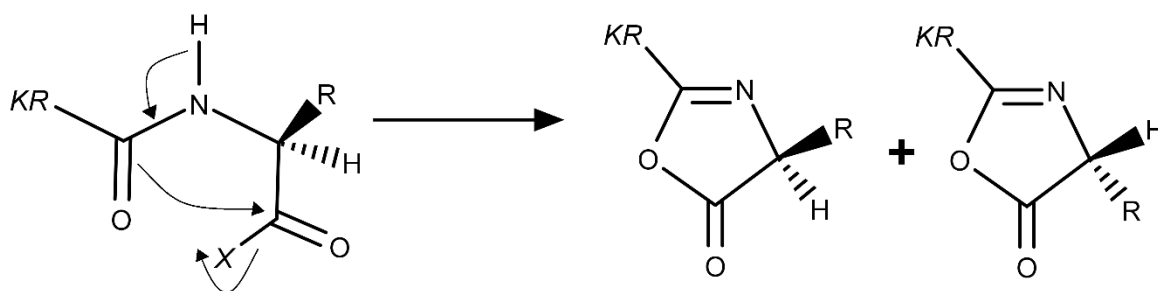
Urooniumi sooli kasutatakse tahkefaasilisel peptiidisünteesil põhiliselt koos fenooli sisaldavate ühenditega, mida peetakse tõhusateks katalüsaatoriteks sidumisreaktsioonides [13]. Näiteks kasutatakse HBTU-d ja TBTU-d koos HOBt-iga (Skeem 5) [13], mida lisatakse reaktsioonisegule aminohappe karbonüülrühma elektrofiilsuse suurendamiseks. See aitab kaasa aminohappe

konversioonile aktiveeritud estriks, mis oleks võimeline edasiste reaktsioonide käigus moodustama peptiidsideme [13].



**Skeem 5.** Aminohappe karboksüülrühma aktiveerimine kasutades TBTU-d ja HOBt-i, kus R on ahelasse lisatava aminohappe struktuur ning R' peptiidijärjestus, millele aminohapet lisatakse. Esmalt reageerib deprotoneeritud aminohape TBTU-ga ning moodustub aktiveeritud vorm. Seejärel reageerib HOBt aktiveeritud aminohappega ning sellele järgneb moodustunud estri sidumine lähtepeptiidile. Reaktsiooni liikumapanevaks jõuks on uurea teke kõrvalsaadusena kuna TBTU on urooniumiühend [13].

HOBt-i kasutamine inhibeerib ka ratsemisatsiooni, mis esineb C-terminaalsel aminohappejägil sidumisreaktsiooni käigus kuna alfa-vesinik ioniseerub ning moodustub vaheühend (Skeem 6). Lisaks ratsemisatsiooni alla surumisele, aitavad inhibiitorid tõsta ka reaktsioonikiirust [16].



**Skeem 6.** Ratsemisatsiooni käigus moodustuv oksasoloonil põhinev vaheühend. KR tähistab kaitserühma, X aktiveeritud karboksüüterminaalset otsa ning R külgrühma.

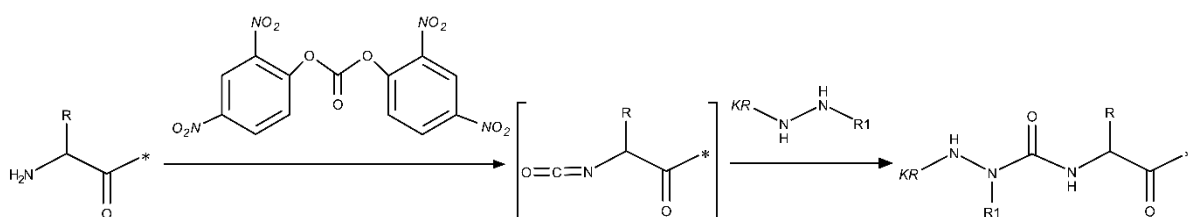
## 2.3 Tahkefaasiline asa-peptiidsüntees

Asa-aminohappejäägi peptiidijärjestusse lisamine on kombinatsioon hüdrasiini- ja peptiidikeemiast [2]. Asa-peptiidide sünteesi lähteaineteks on hüdrasiini derivaadid ehk asendatud hüdrasiinid [19]. Hüdrasiini derivaadid on prekursoriteks mitmetele ühenditele, sealhulgas ka asa-peptiididele [6]. Nende kasutamine asa-peptiidsünteesis eeldab ahelasse lisatavale aminohappejäägile vastava hüdrasiiniühendi kättesaadavust [10].

### 2.3.1 Asa-aminohappejäägi prekursori peptiidijärjestusse lisamine

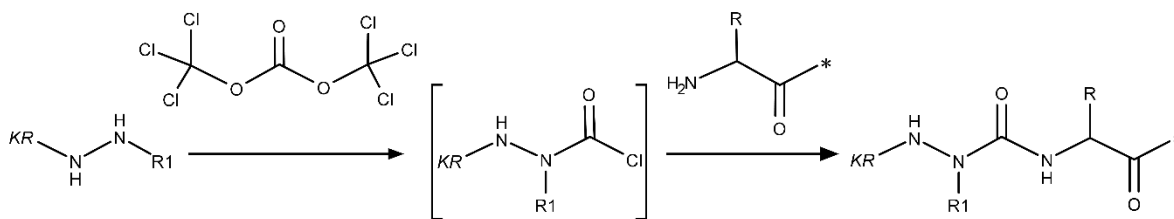
Asa-aminohappejääkide peptiidijärjestusse lisamiseks kasutatakse hüdrasiini derivaate, mis aktiveeritakse karbonüülrühma loovutava reagenti abil ning lisatakse seejärel kaitsmata aminohappejäägile ahelas [4]. Selleks on põhiliselt kaks võimalust [1]:

- 1) Aminohappejäägile vastava hüdrasiiniühendi (prekursori) reaktsioonil aktiivse isotsüanaadiga [5], mis on saadud tahkele kandjale seotud aminohappe N-terminaalse rühma töötlemisel karbonüülrühma loovutavate reagentidega (Skeem 7) [1].



**Skeem 7.** Tahkele kandjale kinnitatud peptiidi N-terminaalse rühma muutmine aktiivseks isotsüanaadiks, mis reageerib vastava järjestusse lisatava aminohappejäägi prekursoriga. KR tähistab kaitserühma, R ja R<sub>1</sub> on külgrühmad ning \* tahke kandja.

- 2) Aminohappejäägile vastava prekursori reaktsioonil fosgeeni või sellega ekvivalentse ühendiga moodustades kloroatsüül derivaadi, mis reageerib edasi lähtepeptiidi vaba N-terminaalse rühmaga (Skeem 8) [5].



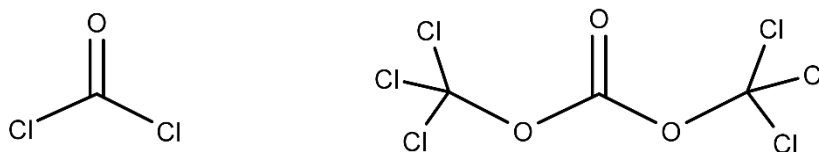
**Skeem 8.** Prekursori reaktsioonil trifosgeeniga moodustub kloroatsüülderivaat, mis reageerib tahkele kandjale kinnitatud aminohappejäägi vaba N-terminaalse rühmaga. KR kirjeldab kaitserühma, R ning R1 on külgrühmad ning \* tahke kandja.

Veel üheks võimaluseks on eelnevalt lahuses valmistatud N-(Boc)-asa-tri- või -dipeptiidi sidumine tahkele kandjale kinnitatud lähtepeptiidi N-terminaalsele rühmale. See lähenemine sobib aga ainult Boc/Bzl tahkefaasilise peptiidsünteesi korral [5].

Karbonüülrühma loovutavate reagentidena kasutatakse asa-peptiidsünteesis tavapeptiidsünteesi aktivaatoreid nagu karbonüüldiimidiasool [20,21], bis(pentafluorofenüül)karbonaat [22–24], p-nitrofenüülkloroformaat [25,26], bis(2,4-nitrofenüül)karbonaat [27], trifosgeen [28] ja fosgeen [5,6].

### 2.3.2 Trifosgeen asa-peptiidsünteesi aktivaatorina

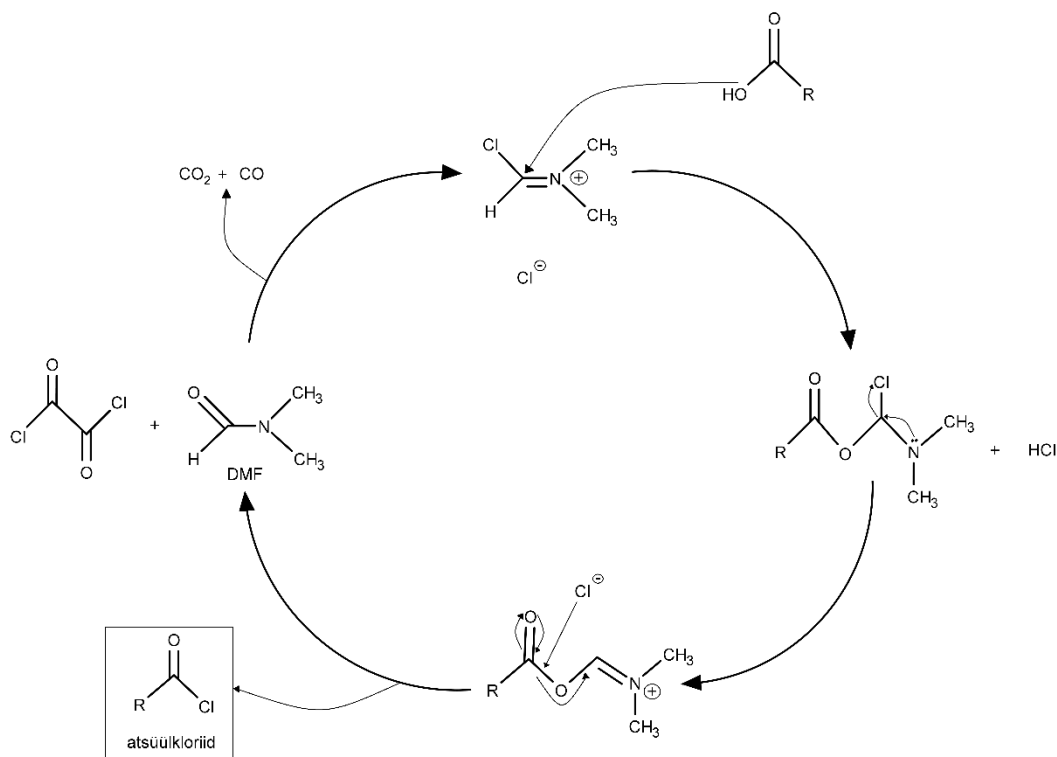
Happehaliidide nagu fosgeen ja trifosgeen (Skeem 9) kasutamine aktivaatoritena on soovituslik peptiidsünteesi korral siis, kui aminohappejääkide ahelasse lisamine on mingil moel takistatud [29]. Seetõttu peetakse trifosgeeni heaks aktivaatoriks keeruliste tahke- ja lahusefaasiliste peptiidsünteeside, sealhulgas vähese reaktsioonivõimega amiinide ning tahkefaasilise asa-peptiidsünteesi korral [2,30]. Näiteks Fmoc-aminohapete korral, mille kõrvalrühmad on hapete suhtes ebastabiilsed, on BTC kasutamine sidumisreaktsioonides andnud häid tulemusi [29]. Selliste peptiidide asa-analoogide sünteesil, mis sisaldavad asa-alaniini-, asa-aspartaadi- ja asa-asparagiinjääke, on samuti kasutatud karboksüülrühma aktiveerimiseks just trifosgeeni [2].



**Skeem 9.** Fosgeen (vasakul) ja trifosgeen (paremal).

Trifosgeeni eeliseks gaasilise fosgeeni ees on tema tahke agregaatolek [31]. Tänu sellele on teda võimalik täpselt kaaluda ning seeläbi õiget kogust reaktsioonides kasutada, aga lihtsam ka transportida ning hoiustada [32,33]. Samas on trifosgeen tahkest olekust sõltumata sama reaktsioonivõimeline kui fosgeen [2], kusjuures ühele moolile trifosgeenile vastab kolm mooli fosgeeni [34]. Kuna BTC laguneb kuumutamisel või ükskõik millise nukleofiiliga reageerimisel fosgeeniks, siis võib see toimuda isegi väga väikese niiskusekoguse toimet [33] ning seetõttu oleks vajalik sünteesi läbi viimine inertses keskkonnas veevaba lahustiga [34]. Kõrge reaktsioonivõimelisuse tõttu ei saa fosgeeni lahustamiseks kasutada näiteks dimetüülformamiidi, mille amiidrühmaga võib toimuda reaktsioon. Seega kasutatakse asendatud hüdrasiini aktiveerimisel fosgeeniga lahustina sageli diklorometaani [4].

Hüdrasiini derivaatide reaktsioonil trifosgeeniga tekib vastav karboksüülhappe kloriid ehk atsüülkloriid [35], mis reageerib edasi tahke kandja küljes oleva peptiidahela vaba N-terminaalse rühmaga [6]. Kui aminohape on juba aktiveeritud, siis viiakse sidumisreaktsioon tihti läbi vähesel hulgal DMF juuresolekul, mis omab protsessis katalüütilist rolli (Skeem 10) [4,13].



**Skeem 10.** DMF katalüütiline roll sünteesireaktsioonis, kus R märgib aminohapet või peptiidi, mille koostisesse aktiveeritav karboksüülrühm kuulub.

Atsüülkloriidi reaktsioonil vaba N-terminaalse rühmaga moodustub amiidside. Reaktsioon viiakse üldiselt läbi aluselises keskkonnas, et reguleerida tekkinud HCl hulka ning vältida amiini muundumist vesinikkloriidsoolaks, mis ei ole reaktsioonivõimeline [13]. Aluselise keskkonna saamiseks kasutatakse tertsiarseid amiine, näiteks DIPEA ja NMM kuna need ei ole nukleofiilsed [16]. Atsüülkloriidide kasutamist peptiidisünteesis limiteerivad üldiselt kõrvalreaktsioonid [13]. Siiski on BTC-ga saavutatud tulemusi, kus tekkinud kõrvalproduktide hulk on väike ning seega saadud sünteesisaagised väga head [36].

### 2.3.3 Asa-peptiidsideme süntees

Trifosgeeni on kasutatud ka asa-aminohappele järgneva aminohappe ahelasse lisamisel, kuna tegemist on kriitilise etapiga [4,6]. Keerukus tuleneb sellest, et asa-aminohappejääk on vähem reaktsioonivõimeline kui tavaline aminohappejääk, mistõttu atsüülimisreaktsioon on raskendatud [37]. Vähenenud reaktsioonivõimelisus on seletatav sellega, et asa-aminohappejäägi N-terminaalne lämmastiku aatom on madalama nukleofiilsusega kui sama lämmastiku aatom asendamata aminohappejäägis [38,39]. Nukleofiilsuste erinevust pole aga asa-peptiidsideme sünteesil enamasti arvesse võetud ning peamiselt sünteesitakse asa-peptiide kasutades tavapeptiidisünteesi protokollid [4].

Hiljuti on meie teadusgrupis läbi viidud kineetiline uurimus, kus võrreldi mudel asa-peptiidis tavapeptiidisünteesi aktivaatorite rakendatavust asa-peptiidsideme moodustamisel [3]. Leiti, et asa-peptiidsideme süntees on palju aeglasem kui peptiidsideme süntees, kusjuures reaktsioonikiirused ja saagised sõltuvad aktivaatori struktuurist. Enamik testitud triasoolil põhinevate aktivaatoritega on reaktsioon aeglane ja ei kulge lõpuni. Oksümal põhinevate aktivaatoritega PyOxim ja COMU läheb reaktsioon praktiliselt lõpuni, kuid võrreldes peptiidsideme sünteesiga on reaktsioon ligikaudu 30 korda aeglasem [3]. Samuti on mudel asa-peptiidis uuritud kuidas mõjutavad aktiveeritud aminohappe kõrvalrühmad asa-peptiidsideme sünteesi efektiivsust aktivaatoriga COMU. Selgus, et steriilise mahukuse suurenemisel aminohappe kõrvalrühmades väheneb asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioonikiirus oluliselt. Kui näiteks reaktsiooni poolestusaeg glütsiiniga on 21 min, siis isoleutsiiniga on poolestusaeg ligikaudu 10 tundi [40]. Seega on asa-peptiidsideme sünteesiks vaja tõhusamaid aktivaatoreid, mis suurendaksid aktiveeritud aminohappe reaktsioonivõimet.



### 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>
BTC	297	-	Merck
DCM	84,93	≥ 99,9	Sigma-Aldrich
DIPEA	129,25	≥ 98,0	Sigma-Aldrich
DMF	73,09	≥ 99,8	Sigma-Aldrich
Et <sub>2</sub> O	74,12	99,9	Lach-Ner
Fmoc-L-Ala- OH*H <sub>2</sub> O	311,32*18,01	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Phe-OH	387,40	-	Iris Biotech
Fmoc-NH-NH- CH <sub>3</sub>	268,3	Kontrollitud TLC testi ja TMR-ga	Sünteesitud A. Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-Rink-Amide 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 Shimadzu LCMS-2020 kromatograafi ja Kinetex 5 µM EVO kolonni (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-Phe-NH-vaik süntees

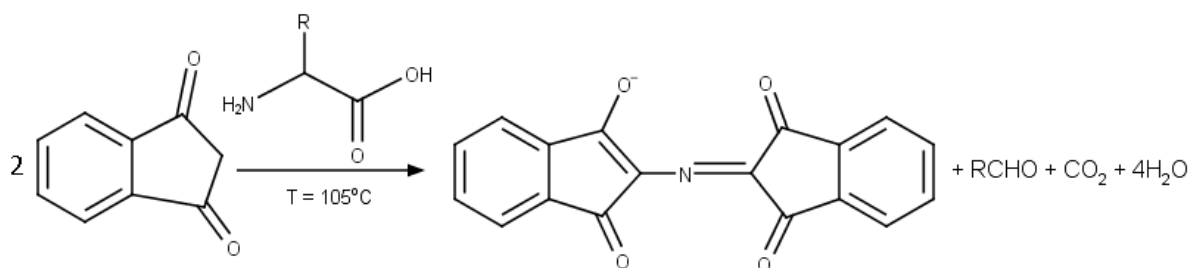
Fmoc-Phe-NH-vaik süntees teostati standardse tahkefaasilise peptiidisünteesi eeskirja alusel [41].

500 mg (1 ekv, 0,34 mmol) Fmoc-Rink-Amiid-MBHA-vaiku (0,68 mmol/g) kaaluti filtriga varustatud reaktsioonikolonnini ning lasti sel 20 minutit diklorometaanis (DCM) punduda. Seejärel eemaldati 20% piperidiini lahusega dimetüülformamiidis (DMF) vaigult Fmoc-kaitserühm (2 min + 20 min) ning jäägid pesti välja kahe lahustiga: 5 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga. 3 ekv Fmoc-L-Phe-OH (1,02 mmol) kaaluti ning lahustati DMF-is. 3 ekv aktivaatorit HOBt (1,02 mmol) ning 3 ekv aktivaatorit TBTU (1,02 mmol) kaaluti ning mõlemad lahustati DMF-is. Seejärel valati kokku lahustatud aktivaatorid ja aminohape ning lisati 6 ekv DIPEA-d (2,04 mmol). Peale eelreaktsiooni, mille käigus toimus lisatava aminohappe karboksüülrühma aktivatsioon, lisati reaktsioonisegu kolonnis olevale tahkele kandjale ning asetati vähemalt üheks tunniks loksutile. Peale reaktsiooni toimumist pesti jäägid välja 3 korda DMF-iga, 3 korda DCM-iga ning taaskord 3 korda DMF-iga.

Fmoc-kaitserühma eemaldamise ning sidumisreaktsiooni edukust jälgiti Kaiseri ehk ninhüdrüini testiga, mis tuvastab vabade aminorühmade olemasolu (Skeem 11) [42]. Selle sooritamiseks võeti väike kogus tahket kandjat, millele lisati komponente A ja B, ning kuumutati 105°C juures 5 minutit. Kui test on negatiivne, ilmub katseklaasi kollakas värvus, positiivne test annab tumesinise värvuse.

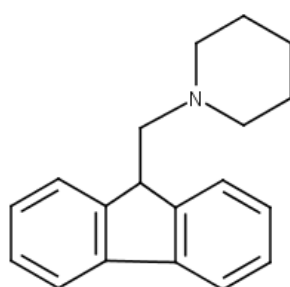
Komponent A: 83,5% fenooli lahus absoluutses etanoolis + 1,3% KCN lahus püridiinis.

Komponent B: 5% ninhüdrüini lahus EtOH-s.



**Skeem 11.** Ninhüdrüini seondumine aminohappe vaba N-terminaalse otsaga.

Lisaks Kaiserit testile jälgiti Fmoc-kaitserühma eemaldumist TLC testiga. Kaitserühma eemaldamise käigus moodustub lisaks vabale aminorühmale ka piperidiinist ja Fmoci vaheühendist dibensofulveenist koosnev lisand (Skeem 12), mis neelab UV-kiirgust [8,15,43]. Testi sooritamiseks kanti pesulahuse laigud silikageeli plaadile ning visualiseeriti UV-lambi all, vaadeldes laikude intensiivsuse kahanemist. Mida intensiivsem on laik, seda rohkem on pesulahuses fluorestseeruvaid kõrvalprodukte. Seega näitab laikude intensiivsuste kahanemine kõrvalproduktide kadumist reaktsioonikeskkonnast. Lisaks viitab pesulahuse laikude intensiivsuste suur erinevus ka sellele, et eelmises etapis on aminohappe kinnitumine järjestusse olnud edukas.



**Skeem 12.** Fmoc-kaitserühma eemaldamise käigus dibensofulveenist ning piperidiinist moodustuv kõrvalprodukt.

### 3.2.2 Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik süntees

Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik süntees teostati varasemalt kasutatud meetodi alusel [4,5], mida on meie uurimisgrupis edasi arendatud [3].

Eelnevalt gaasipõletiga kuumutatud ning lämmastikuga küllastatud 50 ml ümarkolbi kaaluti 4 ekv Fmoc-NH-NH-CH<sub>3</sub> (1,36 mmol). Kolvile asetati lämmastikuga täidetud õhupall ning metüülhüdriin lahustati minimaalses koguses kuivas DCM-s. Kaaluti 1,32 ekv aktivaatorit BTC (0,449 mmol) ning see lahustati 0,5 ml-s kuivas DCM-s. Reaktsioonikolbi lisati 8 ekv DIPEA-d (2,72 mmol), asetati alla jäävann ning kui segu jahutati 0°C-ni, lisati lahustatud BTC. Eelreaktsioonil, mille käigus aktiveeriti lisatava aminohappe karboksüülrühm, lasti toimuda 30 minutit [3]. Seejärel vähendati lahusti hulka roteerimise teel, et eemaldada fosgeenijäägid. Allesjäänud reaktsioonisegu lahustati mõnes ml-s kuivas DCM-s ja kanti üle kolonni, kus eelnevalt sünteesitud Fmoc-Phe-NH-vaik ühendilt (1 ekv, 0,34 mmol) oli juba eemaldatud Fmoc-kaitserühm. Reaktsioonikolonni lisati veel 8 ekv DIPEA-d ning asetati vähemalt 3-ks

tunniks loksutile. Jäägid pesti välja 3x DMF, 3x DCM ja 3x DMF-iga. Sünteesi tulemuslikkuse hindamiseks sooritati Kaiseri test.

### 3.2.3 Mudel asa-peptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> asa-peptiidsideme moodustumise kineetilised mõõtmised

Asa-peptiidsideme moodustumise kineetikat jälgiti kasutades meie uurimisgrupis välja töötatud meetodit [3].

Eelnevalt põletis kuumutatud ning lämmastikuga rikastatud 25 ml-sse ümarkolbi kaaluti 10 ekv Fmoc-L-Ala-OH (0,408 mmol), mis lahustati 4,3 ml-s kuivas DCM-s ning 200 µl-s DMF-s, ja peale asetati lämmastikuga täidetud õhupall. Kolbi lisati 20 ekvivalenti DIPEA-d (0,816 mmol) ning segu jahutati jäävannil 0°C-ni. Seejärel lisati segule aeglaselt läbi süstla eelnevalt kaalutud ning 0,5 milliliitris kuivas DCM-is lahustatud 3,3 ekvivalenti aktivaatorit BTC (0,135 mmol) ning lasti lisatava aminohappe karboksüülrühma aktiveerimiseks vajalikul eelreaktsioonil toimuda 0°C juures 30 minutit.

Samal ajal eemaldati eelnevalt sünteesitud Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik ühendilt (1 ekv, 0,0408 mmol) Fmoc-kaitserühm ning kanti üle 50 ml tsentrifuugituubi 5 ml kuiva DCM abil.

Karboksüülrühma aktiveerimise eelreaktsiooni lõppedes valati reaktsioonikolvi sisu samuti tsentrifuugituubi ning käivitati stopperkell. Reaktsioon viidi läbi 25 °C juures. Kineetilise uurimise sooritamiseks võeti reaktsioonisegust 500 µl proove kindla aja möödudes alates stopperkella käivitamisest.

Proovid kanti 10 ml filtersüstlasse ning neis peatati koheselt reaktsioon reagentide väljapesemise teel (3x DMF, 3x DCM, 3x DMF). Eemaldati Fmoc-kaitserühm, vaigul olevale peptiidile lisati tahkelt kandjalt lõikamiseks happelist lahust (95% TFA / 25% TiS / 25% MilliQ) ning reaktsioonil lasti toimuda 2 h. Pärast tahke kandja eemaldamist aurutati TFA jäägid, segu ekstraheeriti ja tsentrifuugiti 3 korda jääkülma eetriga ning proov aurutati kuivaks [32]. Kineetiliste mõõtmiste käigus võetud proove analüüsiti HPLC-MS-ga kasutades gradientprogrammi (lahus A 0,1% TFA MilliQ-s ja lahus B 0,1% TFA ACN-s; lahus B kontsentratsioon 5-30%; voolukiirus 1 ml/min) ning lähteaine ja produkti piikide pindaladest (S) arvutati lähtepeptiidi (H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub>) kadumine ajas:

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

Võrrand 1.

Reaktsiooni kirjeldab esimest järku kiiruse võrrand:

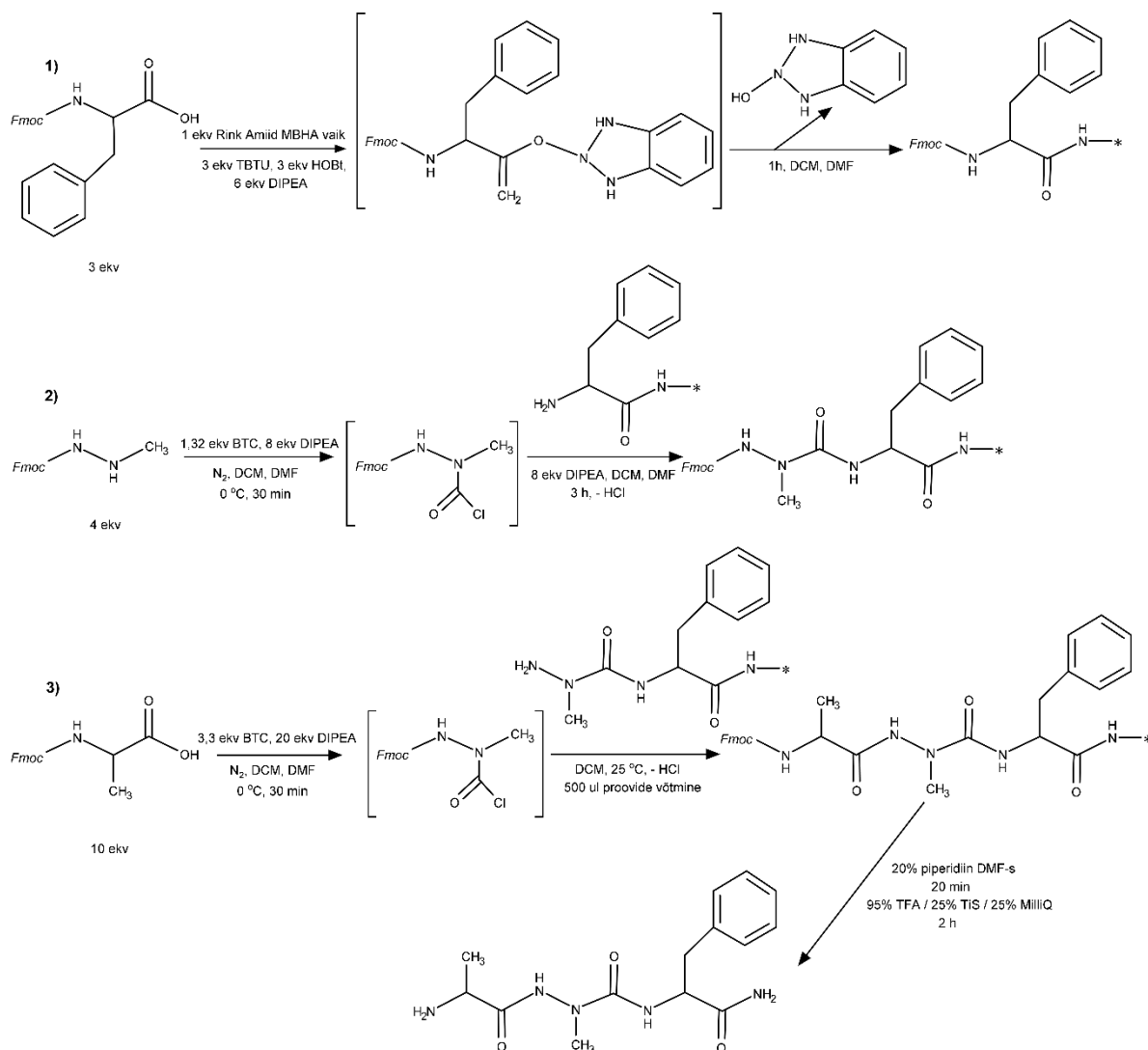
$$Y = e^{-k_{\text{obs}} t} + Y_{\infty}$$

Võrrand 2.

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

## 4. Tulemused ja arutelu

Käesolevas töös sünteesiti asa-peptiid H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> (Skeem 13), kus jälgiti kineetilise meetodiga asa-peptiidsideme moodustumist, kasutades aktivaatorina trifosgeeni (Etapp 3).



**Skeem 13.** Reaktsiooniskeem, kus \* tähistab tahket kandjat. 1) Phe kinnitamine tahkele kandjale; 2) asaAla prekursori viimine ahelasse; 3) asa-peptiidsideme moodustumine, kaitserühma eemaldamine ning peptiidi tahkelt kandjalt vabastamine.

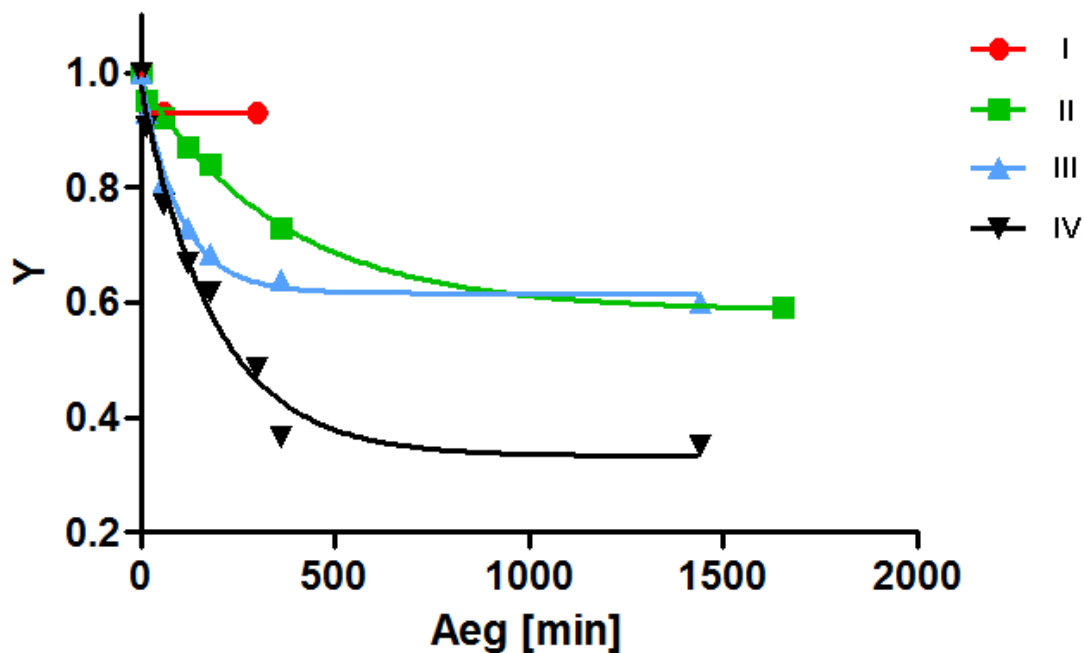
Esmalt kinnitati esimene aminohape (Phe) kaitsmata tahkele kandjale punktis 3.2.1 kirjeldatud eeskirja järgi (Skeem 13, etapp 1). Phe kinnitumist tahkele kandjale kontrolliti Kaiseri testiga (Tabel 1). Seejärel eemaldati Phe-lt Fmoc-kaitserühm, mille efektiivsust jälgiti Kaiseri ja TLC

testidega (Tabel 1). Järgnevalt seoti Phe-le asaAla punktis 3.2.2 toodud eeskirja alusel (Skeem 13, etapp 2). AsaAla sidumise efektiivsust kontrolliti ninhüdriini testiga ning sünteesitud asadipeptiidile tehti ka HPLC-MS analüüs (Lisad 5–6).

**Tabel 1.** Asa-peptiidi H-asaAla-Phe-NH-vaik sünteesi käigus etappide edukuse jälgimine.

<u>Süntees</u>	<u>KT (Fmoc-rühma eemaldamine)</u>	<u>KT (AH sidumise edukuse kontrollimine)</u>	<u>TLC test</u>
Fmoc-Phe-NH-vaik	+	-	+
Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik	+	-	+

Järgmise aminohappe (Ala) lisamine järjestusse on keeruline asaAla hüdrasiinoterminaalse otsa madala nukleofiilsuse tõttu. Seega viidi eeskirja 3.2.3 järgi läbi detailne kineetiline uurimus asapeptiidsideme moodustumise jälgimiseks (Skeem 13, etapp 3). Ala sidumiseks asaAla-le viidi kõigepealt läbi eelnev Ala aktiveerimine aktivaatoriga trifosgeen. Sellele järgnesid asapeptiidsideme moodustumise kineetilised mõõtmised, mida teostati 25 °C juures ning pseudoesimest järku reaktsiooni tingimustes, kasutades Ala 10-kordset ülehulka vaigu suhtes. Protsessi käigus võeti reaktsioonisegust proove, et jälgida lähtepeptiidi kadumist ajas. Proovidelt eemaldati Fmoc-kaitserühm ning analüüsiti HPLC-MS-ga, kus määrati produkti ja lähtepeptiidi piikide pindalade suhe (Võrrand 1) (Lisad 1–4). Vastavalt võrrandile (Võrrand 2) arvutati reaktsiooni I järku kiiruskonstandid ( $k_{\text{obs}}$ ) ja saagised ( $1 - Y_{\infty}$ ), mis on välja toodud tabelis (Tabel 2) ning visualiseeritud joonisel (Joonis 1).



**Joonis 1.** Ühendis Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH-vaik asa-peptiidsideme moodustumise kineetilised kõverad kasutades aktivaatorit BTC temperatuuril 25 °C.

Võimalikult suure asa-peptiidsideme reaktsioonisaagise saavutamiseks tuli punktis 3.2.3 kirjeldatud eeskirja ehk Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH-vaik sünteesi meetodit optimeerida (Tabel 2).

**Tabel 2.** BTC-ga aktiveeritud Fmoc-Ala-OH sidumine lähtepeptiidile H-asaAla-Phe-NH-vaik ning selle kineetiliste mõõtmiste tulemused temperatuuril 25 °C.

<u>Asa-peptiidsideme süntees</u>	<u>Reaktsioonikeskkond</u>	<u><math>k_{\text{obs}}</math> [min<sup>-1</sup>]</u>	<u><math>R^2</math></u>	<u>Saagis (1-Y<sub>∞</sub>)</u>
I	DMF	-	-	0,07 <sup>a</sup>
II	DMF / DCM (1:1)	0,0027 ± 0,0003	0,994	0,41 ± 0,01
III <sup>b</sup>	DCM	0,0100 ± 0,0010	0,994	0,38 ± 0,01
IV <sup>c</sup>	DCM	0,0053 ± 0,0006	0,978	0,67 ± 0,03

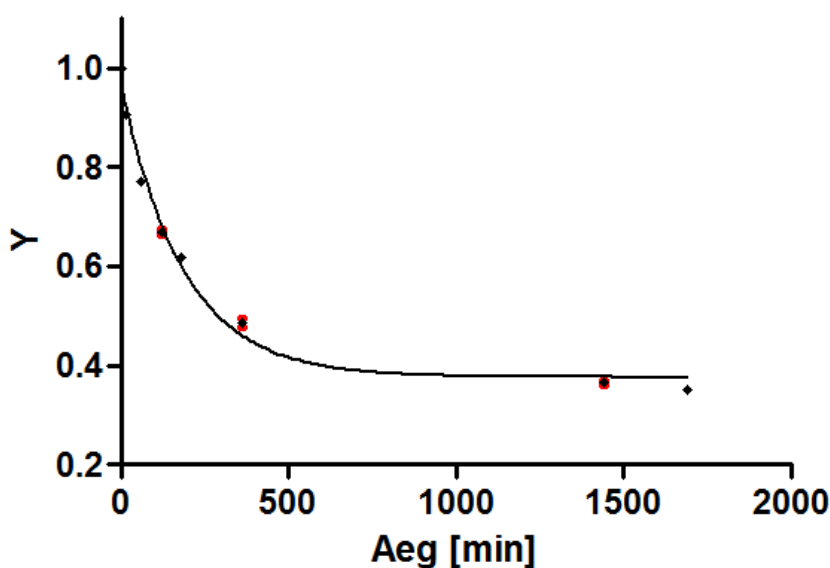
<sup>a</sup> Arvutatud Võrrandi 1 alusel, kus saagis on 1-Y.

<sup>b</sup> BTC lisamise meetod erines teistest katsetest.

<sup>c</sup> Tabelis kajastub 3-e paralleelkatse tulemuste keskmine.



Esimese katse (I) sooritamisel toimiti punktis 3.2.3 kirjeldatud eeskirja järgi, kuid peale Fmoc-Ala-OH aktiveerimist BTC-ga roteeriti reaktsioonisegult lahustina kasutatud DCM pealt ära ning asa-peptiidsideme moodustumise kineetilised mõõtmised teostati 10 ml-s DMF-s. Varasemalt on väidetud, et peptiidsünteesis ei saa aminohappe aktivatsioonil BTC-ga kasutada lahustina DMF, kuna BTC võib reageerida selle amiidrühmaga, kuid aktivatsiooniprotsessile järgnevat peptiidsideme moodustumist see ei mõjuta [4]. Tabelis 1 kajastatud saagise väärtusest on aga näha, et nendes reaktsioonitingimustes asa-peptiidsidet praktiliselt ei moodustunud. Järgnevalt otsustati aminohappe aktiveerimisprotsess läbi viia nagu varasemalt on toimitud aktivaatoriga DIC [3]: lahustina kasutatud DCM ei roteeritud pealt ning kineetilised mõõtmised viidi läbi 10 ml DCM/DMF (1:1) segus (II). Reaktsiooni tulemusena reageeris 41% lähteainest produktiks. Reaktsioonisaagise suurendamise eesmärgil otsustati läbi viia sidumisreaktsioon ka ainult DCM-is (III). Asa-peptiidsideme moodustumine oli ligikaudu 4 korda kiirem võrreldes DMF/DCM (1:1) lahustite segus läbi viidud kineetiliste mõõtmistega (II), kuid nende reaktsioonisaagised olid sarnased. Kuna selle reaktsiooni läbiviimisel lisati BTC aminohappe aktiveerimisel korraka reaktsioonisegusse, mille tulemusena muutus lahus häguseks, otsustati eksperimenti korrata (IV), lisades BTC läbi süstla nagu katsetes I ja II. Asa-peptiidsideme moodustumine oli 2 korda aeglasem, võrreldes katsega III, kuid reaktsioonisaagis suurenes 67%-ni. Samades reaktsioonitingimustes nagu katses IV viidi läbi veel 2 paralleelmõõtmist ning tulemused langesid omavahel hästi kokku (Joonis 2).



**Joonis 2.** Katses IV asa-peptiidsideme moodustumise paralleelmõõtmiste tulemusena saadud kineetiline kõver kasutades aktivaatorit BTC temperatuuril 25 °C.

Käesolevas töös sünteesitud asa-mudelpeptiidiga H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> on hiljuti meie uurimisgrupis läbi viidud asa-peptiidsideme moodustumise kineetilisi uuringuid SPPS aktivaatorite efektiivsuste võrdlemiseks (Tabel 3) [3].

**Tabel 3.** Fmoc-Ala-OH sidumine lähtepeptiidile H-asaAla-Phe-NH-vaik ning selle kineetiliste mõõtmiste tulemused DMF-s temperatuuril 25 °C, kasutades erinevaid aktivaatoreid.

<u>Aktivaator</u>	<u>Lahkuv rühm X</u>	<u>k<sub>obs</sub> [min<sup>-1</sup>]</u>	<u>Saagis</u>
COMU	Oksüma	0,022 ± 0,001	0,99 ± 0,01
PyOxim	Oksüma	0,023 ± 0,001	0,95 ± 0,01
HATU	HOAt	0,017 ± 0,001	0,93 ± 0,01
TBTU	HOBt	0,004 ± 0,001	0,69 ± 0,05
HCTU	6-Cl-HOBt	0,017 ± 0,002	0,68 ± 0,03
<b>BTC<sup>a</sup></b>	<b>Cl</b>	<b>0,0053 ± 0,0006</b>	<b>0,67 ± 0,03</b>
PyBOP	HOBt	0,005 ± 0,002	0,65 ± 0,14
HDMC	6-Cl-HOBt	0,016 ± 0,001	0,55 ± 0,02

<sup>a</sup> Lahustina kasutati DCM-i.

Asa-peptiidside moodustub BTC-ga 4 korda aeglasemalt, võrreldes aktivaatoritega COMU ja PyOxim, ning 3 korda aeglasemalt kui HATU, HCTU ja HDMC-ga. Reaktsioonisaagised BTC-ga jäävad võrreldes kõige efektiivsemate aktivaatoritega COMU, PyOxim ja HATU oluliselt madalamaks. Kineetilise uurimuse tulemused BTC-ga sarnanevad enim TBTU ja PyBOP-ga, mis näitab, et meie uurimisgrupis testitud aktivaatorite võrdluses on asa-peptiidsideme reaktsioonisaagis BTC-ga madal ning kiiruskonstant üks väiksemaid. Seega ei osutunud BTC piisavalt efektiivseks aktivaatoriks ja endiselt oleks tarvis tõhusamaid sidumisreagente, millega saavutada aktiveeritud aminohappe sidumine hüdrasiinoterminaalsetele rühmale.

## 5. Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata aktivaator BTC efektiivsust asa-peptiidsünteesil, uurides kineetilise meetodiga aminohappe seondumist asa-aminohappejäägi hüdrasinoterminaalsete otsale mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub>. Saadud tulemustest järeldus, et asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioon ei lähe lõpuni ja on aeglane ning võrreldes teiste asa-peptiidsünteesis kasutatud aktivaatoritega, on saagis liiga madal. Seega tuleks efektiivsemaks asa-peptiidide sünteesimeetodi välja töötamiseks testida veel tahkefaasilisel peptiidsünteesil kasutatud sidumisreagente või arendada sootuks uusi aktivaatoreid.

## Summary

Peptides are potential drug candidates due to their extensive biological functions. As they decay rapidly in living organisms, peptidomimetics have been developed to increase duration towards enzymatic degradation meanwhile maintaining their good features. One possibility to increase the metabolic stability of peptide is a change of  $\alpha$ -CH group to N atom in one or more amino acid residues resulting aza-peptides. However, bioactivity of aza-peptides is not extensively explored yet as there is a need for more efficient methods to synthesize them.

Recently, several SPPS coupling reagents were tested when synthesizing aza-peptide bond by kinetic methods in our research group. The aza-peptide bond synthesis was approximately 30 times slower than synthesis of peptide bond with most efficient activators. Therefore, more effective activators are required for synthesis of aza-peptide bond.

Triphosgene has been used as an efficient coupling reagent on difficult SPPS couplings and aza-peptide synthesis, but the formation of aza-peptide bond has not been investigated thoroughly yet.

The aim of this research was to evaluate effectivity of BTC as a coupling reagent on synthesis of aza-peptides. Kinetic measurements were performed to examine coupling of amino acid to the aza-amino acid residue in model peptide H-Ala-azaAla-Phe-NH<sub>2</sub>. As a result, the formation of aza-peptide bond is incomplete and slow. Furthermore, the reaction yield is low compared to other tested coupling reagents in aza-peptide synthesis. In conclusion, it is necessary to examine other commercial SPPS coupling reagents or develop new ones in order to elaborate effective aza-peptide synthesis protocol.

## Kasutatud kirjandus

- [1] Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3575-3594.
- [2] 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. of Pept. Sci.* **1997**, *3*, 429-441.
- [3] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron.* **2017**, *58*, 3421-3425.
- [4] 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* (9), 3078-3085.
- [5] 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.
- [6] Freeman, N. S.; Hurevich, M.; Gilon, C. Synthesis of N'-Substituted Ddz-Protected Hydrazines and Their Application in Solid Phase Synthesis of Aza-Peptides. *Tetrahedron.* **2009**, *65* (8), 1737–1745.
- [7] Carey, F. A.; Giuliano, R. M. Organic Chemistry, 8th ed.; McGraw-Hill: New York, United States of America, 2011, p. 1137.
- [8] 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.
- [9] Hess, H.-J.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. N- [2-isopropyl-3-(L-Aspartyl-L-Arginyl)-carbazoyl]-L-Tyrosyl-L-Valyl-L-Histidyl-L-Prolyl-L-Phenylalanine, an Isostere of Bovine Angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (24), 4040 – 4041.
- [10] Gupton, B. F.; Carroll, D. L.; Tuhy, P. M.; Kam, C. M.; Powers, J. C. Reaction of Azapeptides with Chymotrypsin-Like Enzymes. New Inhibitors and Active Site Titrants for

Chymotrypsin A Alpha, Subtilisin BPN', Subtilisin Carlsberg, and Human Leukocyte Cathepsin. *G. J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4279.

[11] 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.

[12] Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1541.

[13] Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron.* **2005**, *61* (46), 10827–10852.

[14] Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149.

[15] 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.

[16] 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.

[17] *Coupling reagents and additives offered by Bachem;*

[http://documents.bachem.com/coupling\\_reagents.pdf](http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf) viimati alla laetud 11.04.2018.

[18] 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.

[19] Zega, A.; Urleb, U. Azapeptides. *Acta Chim. Slov.* **2002**, *49*, 649–662.

[20] Wiczerzak, E.; Drabik, P.; Lankiewicz, L.; Oldziej, S.; Grzonka, Z.; Abrahamson, M.; Grubb, A; Broemme, D. Azapeptides Structurally Based upon Inhibitory Sites of Cystatins as Potent and Selective Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (19), 4202-4211.

[21] 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*, 3541-3552.

[22] Dutta, A. S.; Morley, J. S. Polypeptides. Part XIII. Preparation of  $\alpha$ -Aza-Amino-Acid (Carbamic Acid) Derivatives and Intermediates for the Preparation of  $\alpha$ -Aza-Peptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1975**, *0*, 1712-1720.

- [23] Hansen, T. K. Synthesis of Azapeptides from Hindered Amines Leading to Novel Growth Hormone Secretagogues. *Tetrahedron*. **1999**, *40*, 9119-9120.
- [24] Han, H.; Janda, K. D. Azatides: Solution and Liquid Phase Syntheses of a New Peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2539-2544.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of Azapeptides by the Fmoc/tert-Butyl/Polyamide Technique. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, *0*, 2843-2849.
- [28] 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.
- [29] Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 2447-2467.
- [30] 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*. **2002**, *43*, 5013-5015.
- [31] Zhou, Y.; Gong, R.; Miao, W. New Method of Synthesizing N-Alkoxy carbonyl-N-Arylamide with Triphosgene. *Synthetic Communications*. **2006**, *36* (18): 2661-2666.
- [32] Damle, S. B. Safe handling of diphosgene, triphosgene. *C&E News*. **1993**, *71* (6): 4.
- [33] Cotarca, L.; Geller, T.; Repasi, J. BTC: A Safer Alternative to Phosgene? *Org. Process. Res. Dev.* **2017**, *21*, 1439-1446.
- [34] Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; 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. Peptide Res.* **1999**, *53*, 507-517.

- [35] Zega, A.; Mlinsek, G.; Sepic, P.; Grdadolnik, 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.
- [36] Zouikri, M.; Vicherat, A.; Aubry, A.; Marraud, M.; Boussard, G. J. Azaproline as a Beta-Turn-Inducer Residue Opposed to Proline. *Pept. Res.* **1998**, *52*, 19–26.
- [37] Gray, C. J.; Quibell, M.; Bagget, N.; Hammerle, T. Incorporation of Azaglutamine Residues Into Peptides Synthesised by the Ultra-High Load Solid (Gel)-Phase Technique. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 351-362.
- [38] Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the  $\alpha$ -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 8142–8155.
- [39] Garcia-Ramos, Y.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Synthesis of Hydrazine and Azapeptide Derivates by Alkylation of Carbazates and Semicarbazones. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 985–993.
- [40] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron.* **2018**, *59* (21), 2010-2013.
- [41] Solid Phase Peptide Synthesis by Fmoc-Chemistry: Manual for the Laboratory Course winter-spring. Koostatud TÜ tehnoloogiainstituudis, Prof Ü. Langeli teadusgrupi poolt (**2014**).
- [42] 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. *Analyt. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [43] 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.



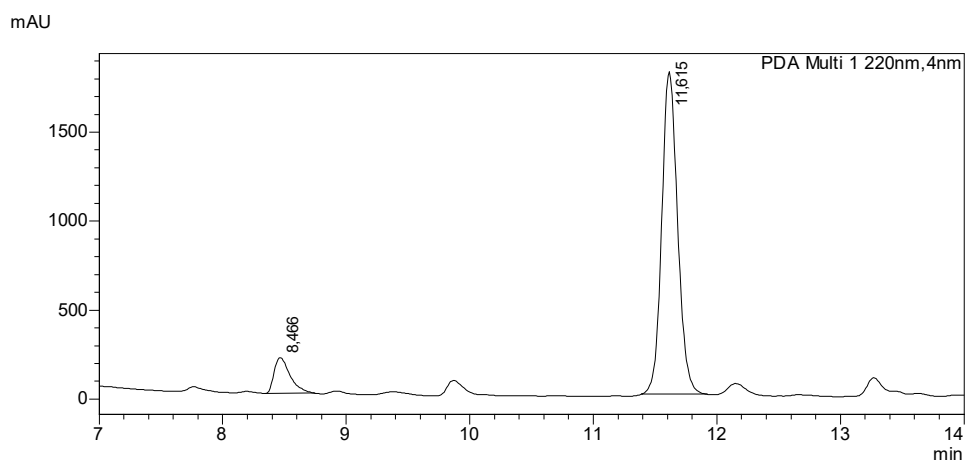
## Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada Anton Mastitski (MSc) teadusgruppi asala peptiidjärjestusse lisamiseks vajaliku prekursori sünteesimise eest. Lisaks avaldatakse tänu juhendajatele dr Anu Ploom ja Meeli Arujõe (MSc), kes olid toeks ning abiks käesoleva bakalaureusetöö valmimisele.

Samuti soovib autor tänada oma perekonda igakülgse toetuse ning mõistmise eest.

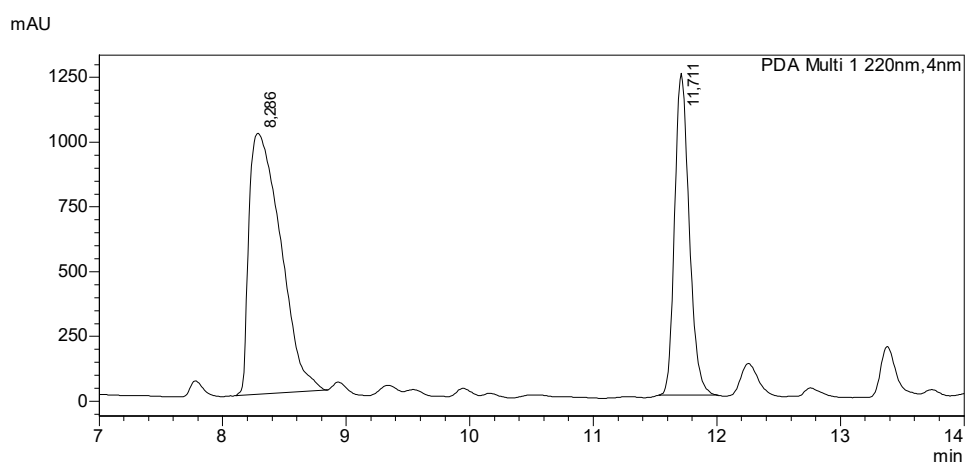
## Lisad

1)



**Lähtepeptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> (paremal) ja produkti H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> (vasakul)  
HPLC neeldumisspekter IV katse 15-ndal min.**

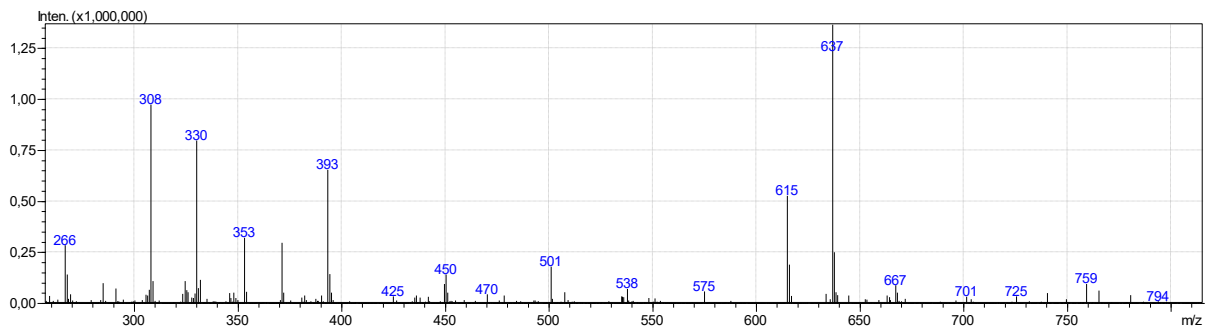
2)



**Lähtepeptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> (paremal) ja produkti H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> (vasakul)  
HPLC neeldumisspekter IV katse 53 h ja 35-ndal min.**

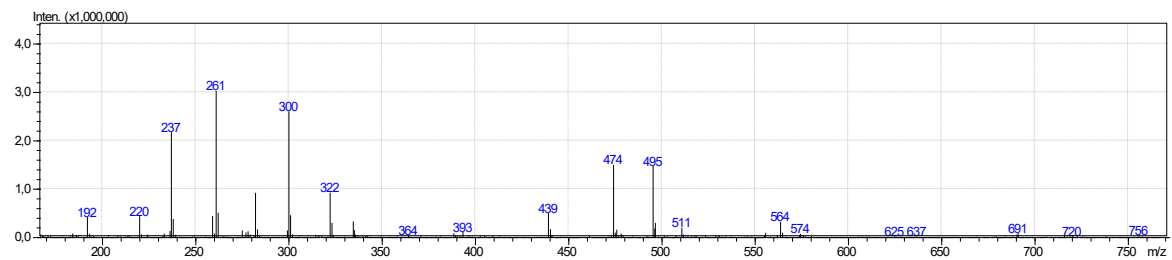
Kromatogrammidel on näha produktpeptiidi piigi kasv ajas võttes proove reaktsioonisegust, kus toimus Ala sidumine lähtepeptiidile asaAla-Phe-NH-vaik. Proovid lahustati 5% ACN/H<sub>2</sub>O lahuses ning sisestati manuaalselt kogusena 40 µl. Proovide analüüsimiseks kasutati gradientprogrammi, kus puhver B (0,1% TFA ACN-is) sisaldus kasvas ajas (puhver A 0,1% TFA H<sub>2</sub>O-s), kusjuures voolukiirus oli 1 ml/min. Ühendid detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

3)



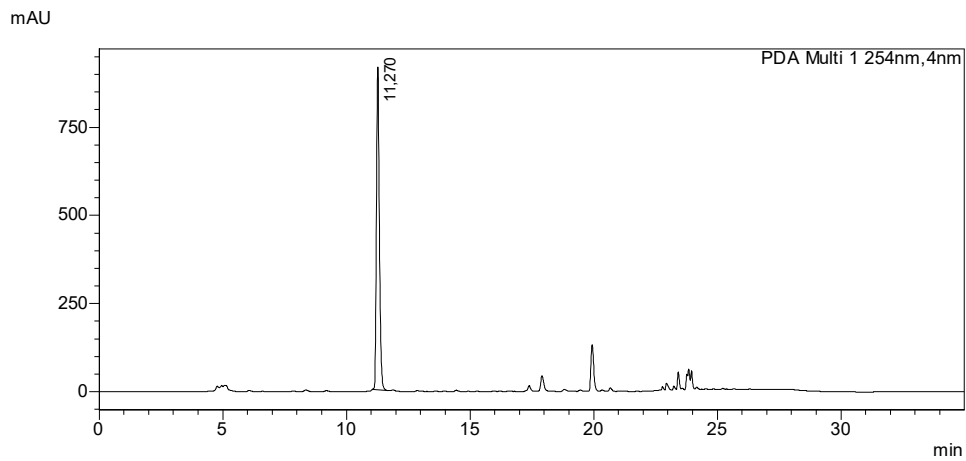
**Produkti H-Ala-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> massispekter IV katse reaktsioonisegust võetud proovis:**  
[M+H]<sup>+</sup>; [M+Na]<sup>+</sup>; [2M+H]<sup>+</sup>; [2M+Na]<sup>+</sup>.

4)



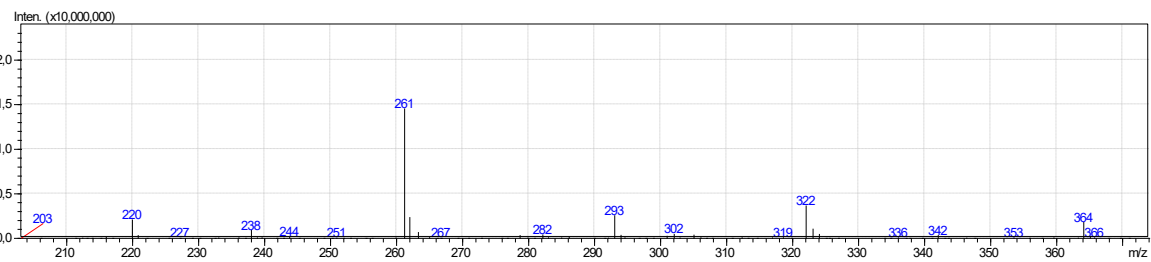
**Lähteptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> massispekter IV katse reaktsioonisegust võetud proovis:** [M+H]<sup>+</sup>; [M+Na]<sup>+</sup>; [M+ACN+Na]<sup>+</sup>; [2M+H]<sup>+</sup>; [2M+Na]<sup>+</sup>.

5)



**Lähtepeptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> HPLC neeldumisspekter.**

6)



**Lähtepeptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> massispekter: [M+Na]<sup>+</sup>.**

Lisades 5 ja 6 on visualiseeritud lähtepeptiidi H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> neeldumis- ja massispekter, mis on saadud valmis sünteesitud H-asaAla-Phe-NH<sub>2</sub> manuaalsel sisestamisel HPLC-MS-i.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Heleri Heike Härk,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga trifosgeen“,

mille juhendajad on Anu Ploom (PhD) ja Meeli Arujõe (MSc),

1.
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2018**