

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
keemia instituut

Alla Troska

Peptiid- ja asa-peptiidsideme tekke kineetiline uurimus

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: Anu Ploom, PhD
Meeli Arujõe, MSc

Tartu 2017

Peptiid- ja asa-peptiidsideme tekke kineetiline uurimus

Peptiidid on tuntud bioaktiivsed ained, mida kasutatakse laialdaselt ravimite jne. tootmisel. Peptiidide kasutamist ravimitena piirab nende kiire lagunemine elusorganismis. Nende lagunemise pidurdamiseks luuakse peptidomimeetikuid - peptiide imiteerivaid aineid, nt asa-peptiide.

Töö eesmärgiks oli võrrelda mudelpeptiidides H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ peptiid- ja asa-peptiidsideme moodustumist kasutades tahke faasi peptiidisünteesi meetodit (SPPS). Tulemusena saadi peaaegu täielikult atsüleerunud peptiid- või asa-peptiid. Asa-peptiidsideme süntees aminohappe aktiveerimisel aktivaatoriga PyOxim oli palju aeglasem võrreldes peptiidsideme moodustumisega. Tulemused näitavad, et tavalist SPPS protokollit ei saa rakendada otseselt asa-peptiidisünteesis. Aminohappe reaktsioonivõime suurendamiseks on vaja tõhusamaid aktivaatoreid, et saavutada asa-aminohappe semikarbasiidse osa efektiivsem atsüleerumine asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioonil.

Märksõnad: Asa-peptiidid; Kineetika; Oxyma; Peptiidid; PyOxim; SPPS

P390 – Orgaaniline keemia

Kinetic study of peptide and aza-peptide bond formation

Peptides are widely used in medicine due to specificity against target sites as well as biocompatibility. Being biologically active reagents, peptides are well recognised by human body and decomposed very quickly. Peptidomimetics, as aza-peptides, maintain the biological effect of the parent peptide, as well as remove undesirable properties.

The purpose of this work was to compare kinetically peptide and aza-peptide bond formation in model peptides H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ respectively. Both reactions led to nearly complete acylations of the resin-linked peptide and the aza-peptide. However, synthesis of aza-peptide bond was much slower than the one of common peptide bond when conventional coupling agent PyOxim was used for amino acid activation. These results demonstrate that the conventional SPPS protocol cannot be directly applied to aza-peptide synthesis and that new coupling agents are needed to increase the reactivity of the activated amino acid to achieve effective acylation of the semicarbazide moiety during the aza-peptide bond formation reaction.

Keywords: Aza-peptides; Kinetics; Oxyma; Peptides; PyOxim; SPPS

P390 – Organic chemistry

SISUKORD

Kasutatud lühendid.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Peptiidid. Tahke faasi peptiidisüntees.....	7
1.1.1 Aktivaatorid.....	9
1.1.2 Kaitserühmad	12
1.2 Asa-peptiidid. Tahke faasi asa-peptiidisüntees.	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Töös kasutatud reaktiivid	15
2.2 Aparatuur ja töövahendid	15
2.3 Sünteaside kirjeldused.....	16
2.3.1 Fmoc-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik sünteasid	16
2.3.2 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine	16
2.3.3 Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik süntees.....	17
2.3.4 Kineetilised mõõtmised	18
2.3.5 Kineetiliste andmete analüüs	18
3. TULEMUSED JA ARUTELU	20
4. KOKKUVÕTE	24
SUMMARY	25
KASUTATUD KIRJANDUS:	26
Tänuavaldus	30
LISA:.....	31

Kasutatud lühendid

<u>Lühend</u>	<u>Ingliskeelne nimetus</u>	<u>Eestikeelne nimetus</u>
Ala	Alanine	Alaniin
ACN	Acetonitrile	Atsetonitriil
BDMP	5-(1H-benzotriazol-1-yloxy)-3,4-dihydro-1-methyl-2H-pyrrolium hexachloroantimonate	5-(1H-bensotriasool-1-üloksü)-3,4-dihüdro-1-metüül-2H-pürroolium heksakloroantimonaat
BHA	Benzhydramine	Benshüdrüülamiin
Boc/Bn	Butyloxycarbonyl/Benzyl	Butüüloksükarbonüül/Bensüül
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate	(Bensotriasool-1-üloksü)tris(dimetüülamino)fosfoonium heksafluorofosfaat
BTC	Bis(trichloromethyl)carbonate	Bis(triklorometüül)karbonaat
DCM	Dichloromethane	Diklorometaan
DiPEA	N,N-Diisopropylethylamine	N,N-Diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-Dimethylformamide	N,N-Dimetüülformamiid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-(1,3,5)triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride	4-(4,6-Dimetoksü-(1,3,5)triasiin-2-üül)-4-metüül-morfoliiniumkloriid
EtOH	Ethanol	Etanool
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	9-Fluorenüülmetoksükarbonüül
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate	O-(Bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülluroonium heksafluorofosfaat
HMPA	Hexamethylphosphoramide	Heksametüülfosforamiid
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole	1-Hüdroksü-7-asabensotriasool
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	1-Hüdroksübensotriasool
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography mass spectrometry	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia massispektromeetria
KCN	Potassium cyanide	Kaaliumtsüaniid
MBHA	4-Methylbenzhydramine	4-Metüülbenshüdrüülamiin
Oxyma	2-Cyano-2-(hydroxyimino)acetate	2-Tsüano-2-(hüdroksüimino)atsetaat

Phe	Phenylalanine	Fenüülalaniin
PyOxim	[Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate-O ²]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate	[Etüülsüano(hüdroksüimiino)atsetaat-O ²]tri-1-pürrolidinüülfosfoonium heksafluorofosfaat
Ser	Serine	Seriin
SPPS	Solid-phase peptide synthesis	Tahke faasi peptiidisüntees
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate	O-(Bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluuronium tetrafluoroboraat
tBu	Tertiary butyl	Tert-butüül
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroetaanhape
Thr	Threonine	Treoniin
TIS	Triisopropylsilane	Triisopropüülsilaan
TLC	Thin-layer chromatography	Õhukese kihi kromatograafia
TMR	Nuclear magnetic resonance	Tuumamagnetresonants
Tyr	Tyrosine	Türosiin
UV-kiirgus	Ultraviolet radiation	Ultraviolettkiirgus

SISSEJUHATUS

Peptiidid on tuntud bioaktiivsed ained, mida kasutatakse laialdaselt ravimite, toidulisandite jne. tootmisel. Peptiidide kasutamist ravimitena piirab nende kiire lagunemine elusorganismis. Nende lagunemise pidurdamiseks luuakse peptidomimeetikuid - peptiide imiteerivaid aineid, nt asa-peptiide [1,2]. Asa-peptiidid on peptiidi analoogid, kus üks või enam α -süsinikku peaahele on asendatud lämmastikuga, mis põhjustab molekuli geomeetria muutust, seega ka biokeemiliste omaduste muutust. Nad lagunevad organismis aeglasemalt kui peptiidid, kuna nende lagundamiseks puuduvad vajalikud ensüümid.

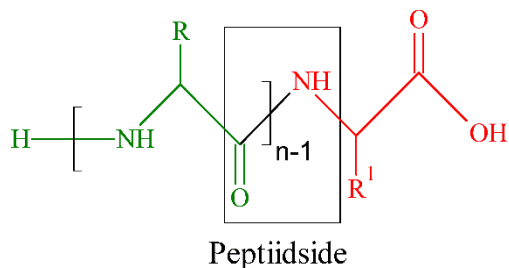
Tahke faasi peptiidisünteesi meetodika (SPPS) abil saadud asa-peptiidsideme madalate reaktsioonisaagiste ning aeganõudva reaktsiooni tõttu [3] on asa-peptidomimeetikute kui ravimikandidaatide omadusi vähe uuritud [1,2,4–6]. See on tingitud asa-aminohapete hüdrasino-terminaalse otsa väiksemast nukleofiilsusest võrreldes peptiidi amino-terminaalse otsaga [7]. Samuti ei ole asa-aminohapete prekursoritena kasutatavad alküülhüdrasiinid nende ebapüsivuse tõttu kommertsiaalselt saadaval. Enamus uuringuid ei võta erinevusi peptiidi- ja asa-peptiidikeemia vahel arvesse ning väidetakse isegi, et asa-peptiide on võimalik kergesti sünteesida kasutades peptiidisünteesi protokollid [8].

Töö eesmärgiks on võrrelda peptiid- ja asa-peptiidsideme moodustumist mudelpeptiidide H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ näitel kasutades tahke faasi peptiidisünteesi meetodit. Meile teadaolevalt ei ole seni süstemaatilist kineetilist uurimust asa-peptiidsideme moodustumise kohta avaldatud. See võimaldab hinnata tahke faasi peptiidisünteesi protokollid rakendatavust asa-peptiidsideme moodustamisel. Eeldatavasti on määratavad kineetilised parameetrid abiks efektiivsema asa-peptiidsideme sünteesi meetodika väljatöötamisel, millega tegeleb M. Arujõe oma doktoritöö raames.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Peptiidid. Tahke faasi peptiidsüntees.

Peptiidid on bioloogiliselt olulised amiidid või polüamiidid, kus aminohapped on omavahel seotud amiid- ehk peptiidsidemetega:



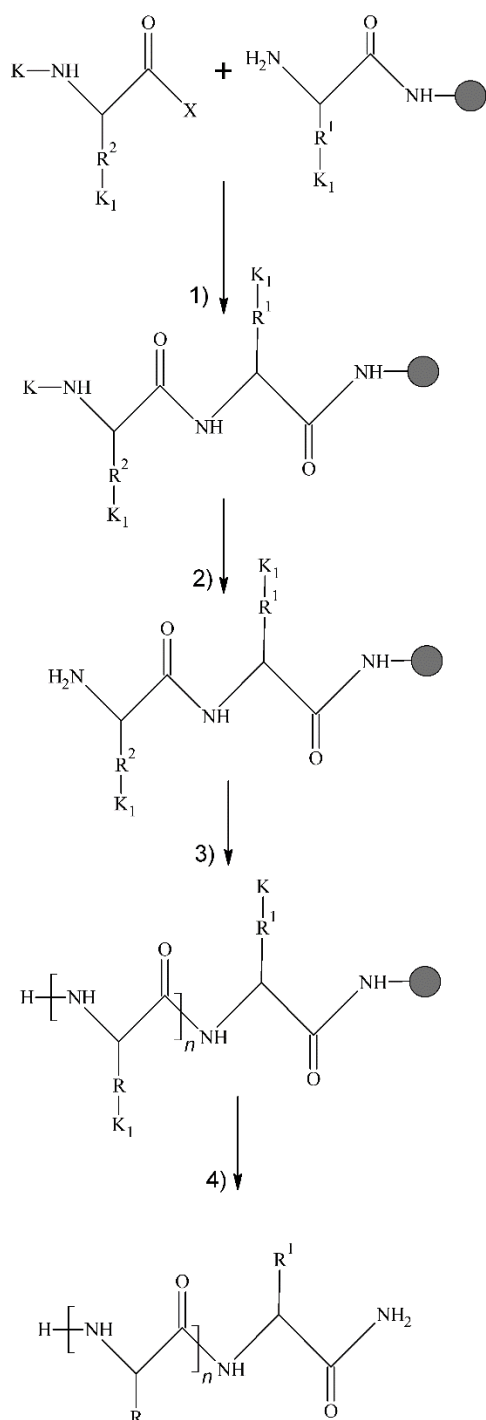
Skeem 1. Peptiidi üldine struktuur, kus R ja R¹ on külgrühmad ja n on võrdne aminohappejääkide arvuga

Kõige levinumad on lineaarsed peptiidid, kuid on ka olemas tsüklilisi peptiide. Looduses esineb üle 700 erineva aminohappe, aga enamasti vaadeldakse ainult 20 standardaminohapet, mida kodeerib DNA valgusünteesi käigus. Need on nn kodeeritavad aminohapped, millest osa aminohappeid toodab inimorganism ise, ülejäänud on asendamatud aminohapped ning need peab saama toiduga [9]. Kõik need aminohapped on α asetusega ning kõik, va proliin, sisaldavad primaarset aminorühma [10].

Lisaks looduslikele peptiididele saadakse neid ka sünteetiliselt amino- ning karboksüülrühma reageerimisel ning selle reaktsiooni käigus eraldub vesi [11]. Peptiidsüntees on aeganõudvam, kui looduslike peptiidide saamine. Samas peptiid-analoogide kasutamine on odavam, mis on suur eelis. Keemiline peptiidsüntees on ka väga tähtis looduslike peptiide primaarstruktuuri tõestamiseks ning lisaks uuritakse sünteetiliste analoogide abil struktuuri ja aktiivsuse omavahelist sõltuvust [11].

Peptiidsünteesi teostatakse nii lahuses kui ka tahkel kandjal. Need erinevad üksteisest läbiviimise keskkonnalt, kuigi üldpõhimõte on sama [10].

Laborites kasutatakse tavaliselt tahke faasi peptiidsünteesi ehk Merrifield'i meetodit (Skeem 2) [12].



Skeem 2. Peptiidisünteesi skeem, kus R on külgrühm, K – kaitserühm, K_1 – külgrühma kaitserühm, X on aminohape aktiveeriv rühm, $n+1$ – aminohapejääkide arv ja \bullet - tahke kandja . Peptiidisünteesi etapid: 1) N-terminaalselt kaitstud ja aktiveeritud karboksüülrühmaga aminohape sidumine kaitsemata aminorühma külge, 2) N-terminaalse kaitserühma eemaldamine, 3) aminohape sidumise ja kaitserühma eemaldamise etappide kordamine, 4) püsivate kaitserühmade eemaldamine ning peptiidi maha võtmine tahkelt kandjalt.

Tahkeks kandjaks on polümeer, mis ei lahustu solventides ning selle külge seotakse esimene aminohape kovalentse sideme kaudu. Kõige levinum on süntees karboksüülrühmast aminorühma suunas, milleks kasutatakse MBHA või BHA vaike. Peale aminohappe sidumist pikendatakse peptiidi ahelat vastavas järjekorras, korrates sidestumise ja N-terminaalse kaitserühma eemaldamise etappe (Skeem 2, etapid 1 ja 2). See on väga mugav, üsna kiire ja odav meetod. Reaktsiooni võib läbi viia ühes reaktsiooninõus, on võimalus kasutada reagente ülehulgas ning kõrvalreaktsiooni produktid on välja pestavad. Meetodi puuduseks on suur solvendi kulu [12].

1.1.1 Aktivaatorid

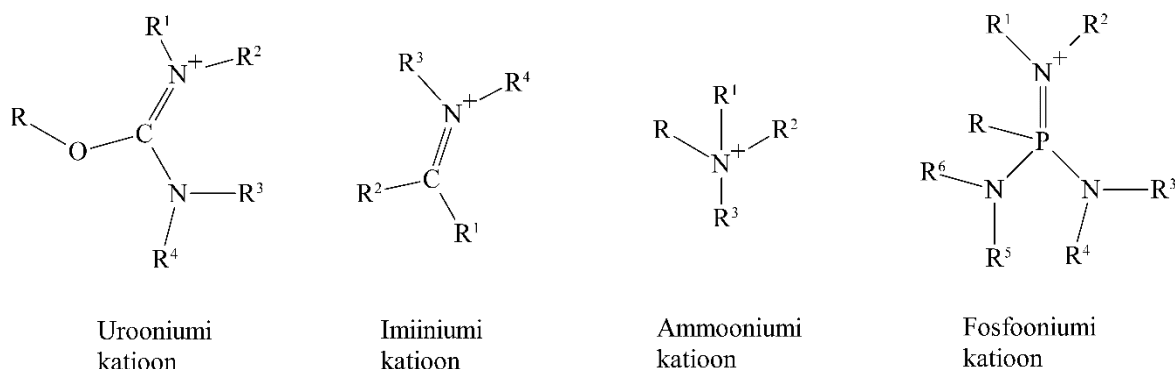
Peptiidside tekib amino- ja karboksüülrühma omavahelisel reageerimisel (Skeem 2, etapp 1). Tõhusamaks peptiidideme moodustamiseks on vaja karboksüülrühm keemiliselt aktiveerida. Peptiidisünteesi õnnestumine sõltub peamiselt kahest faktorist: kasutatud ühenditest liituva aminohappe karboksüülrühma keemiliselt aktiivseks muutmiseks ehk aktivaatori(te)st ning meetodist N-terminaalse otsa kaitsmiseks ehk kaitserühma(de)st [13][14]. Aktivaatorid kiirendavad reaktsiooni, aitavad ära hoida kõrvalproduktide teket ja ratsemisatsiooni ning tagavad kõrgemad saagised [15]. Liituva aminohappe karboksüülrühma aktiveerimismehhanismid põhinevad antud rühma aktiivseteks atsüülhaliidideks, anhüdriidideks, atsüülasiidideks, atsüülimidiasoolideks või estriteks muutmisel, millest enim kasutatakse viimast meetodit.

Karboksüülrühma aktiveerimiseks kasutatakse peamiselt kahte meetodit: a) karboksüülhappe aktiveerimist *in situ* või b) valmistatakse aktiveeritud karboksüülhappe *in situ* enne sidestumisreaktsiooni, mis isoleeritakse, puhastatakse ja karakteriseeritakse [13].

Aktivaatoreid klassifitseeritakse erinevalt ning igal sidestumisreagendil on omad eelised (nt madal ratsemisatsioon) ja puudused (nt halvasti lahustuvad/välja pestavad kõrvalproduktid). Aminohappe karboksüülrühma aktiivseks estriks muutmiseks enim kasutatavad aktivaatorid on karbodiimiidid ja nn ooniumi soolad.

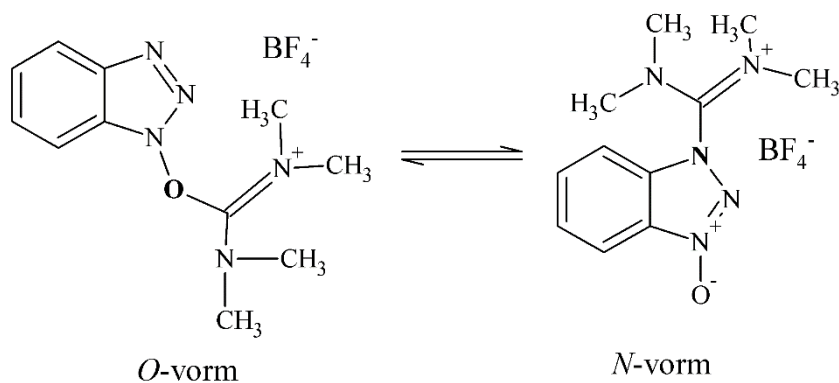
Karbodiimiidid (nt DCC) on esimesed aktivaatorid, mida hakati peptiidisünteesis kasutama [16]. Nende kasutamine üldjuhul muudab reaktsiooni kiireks ja tagab keskmised saagised [17], kuid reaktsiooni jooksul tekivad kõrvalproduktid. Lisaks sellele on nende käsitlemine raskendatud, kuna diimiidid on mürgised, kantserogeensed ja suure niiskustundlikkusega. Karbodiimiididega koos kasutatakse tihti lisareagentidena triasooli, nt HOBt ja HOAt. Need võimaldavad vältida peptiidide epimerisatsiooni ning aminohapete ratsemisatsiooni [18].

Ooniumi soolad rühmitatakse nende struktuuri järgi urooniumi [18], imiiniumi [15], ammooniumi [19] ja fosfooniumi sooladeks [18], mille katiooni struktuurid on järgmised:



Enamus ooniumi katioone seotakse bensotriasoolidega (HOBt, HOAt), mis on ka kõige laiemalt levinud ja kasutatavad. Järjest enam aga tuuakse välja bensotriasoolide plahvatusohtlikkus, mida varem eirati [18,20]. Selle probleemi lahendamiseks töötatakse välja ohutumaid ja tervist vähem kahjustavaid reagente.

Urooniumi sooladel (nt. TBTU, HBTU) põhinevad aktivaatorid esinevad lahuses urooniumi (*O*-vorm) ja guanidiiniumi (*N*-vorm) isomeeridena, mis on omavahel tasakaalus (Skeem 3) [15,18].



Skeem 3. TBTU *O*- ja *N*-vorm

Peptiidisünteesis on aminohappe sidestumisel urooniumi sooladega edasiviivaks jõuks kõrvalproduktina urea derivaadi teke. Sidestumisreaktsiooni kõrvalproduktina võib moodustuda ka guanidiin, mille teket võib vähendada suurendades HOBt-i kogust [15]. Katsetega on tehtud kindlaks, et soolade anioon (BF₄⁻, PF₆⁻) ei mõjuta praktiliselt ühendi reaktsioonivõimet [18].

Näiteks TBTU ja HBTU erinevad teineteisest vaid aniooni poolest, aga keemilistelt omadustelt on need peaaegu identsed ja väga laialt kasutatavad aktivaatorid.

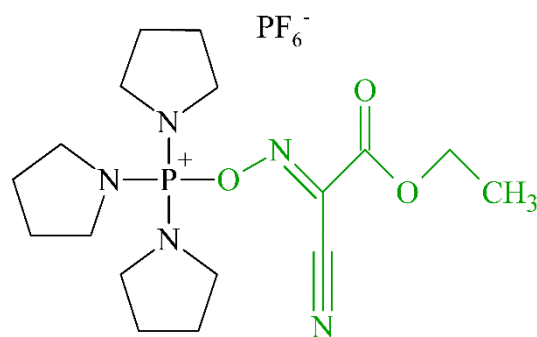
Imiiniumil (nt BDMP [21]) põhinevad reagentid on urooniumi soolade analoogid, millele rakenduvad analoogsed mehhanismid. Imiiniumi sooli kasutatakse kas iseseisvalt või segus HOBt-iga [15].

Ammooniumi soolad (nt DMTMM) on laialt levinud aktivaatorid estrite sidestamisel nii tahke kui vedelfaasi peptidisünteesis. Karboksüülrühma aktiveerimisel ratsemisatsiooni ja kõrvalreaktsioonide vältimiseks kasutatakse aluselist keskkonda, seega paljude aktivaatorite puhul on vajalik aluse lisamine [22]. *In situ* reaktsioonis DMTMM-ga eraldub reaktsiooni käigus N-metüül-morfoliin, seetõttu pole alust juurde vaja lisada. Lisaks sellele on DMTMM-i eeliseks sünteesi käigus veega kergesti välja pestavad tekkinud kõrvalproduktid [15].

Fosfooniumi soolad moodustavad veel ühe suure peptidisünteesis kasutatavate aktivaatorite perekonna. Esimeseks fosfooniumgrupil põhinevaks soolaks oli BOP, nn Castro's reagent [23]. BOP on väga efektiivne reagent aga atsüülimise reaktsiooni jooksul tekkiv HMPA on väga toksiline ühend [15]. Fosfooniumi sooladega ei teki kõrvalprodukti guanidiin, mis on suur eelis võrreldes teiste aktivaatoritega [18].

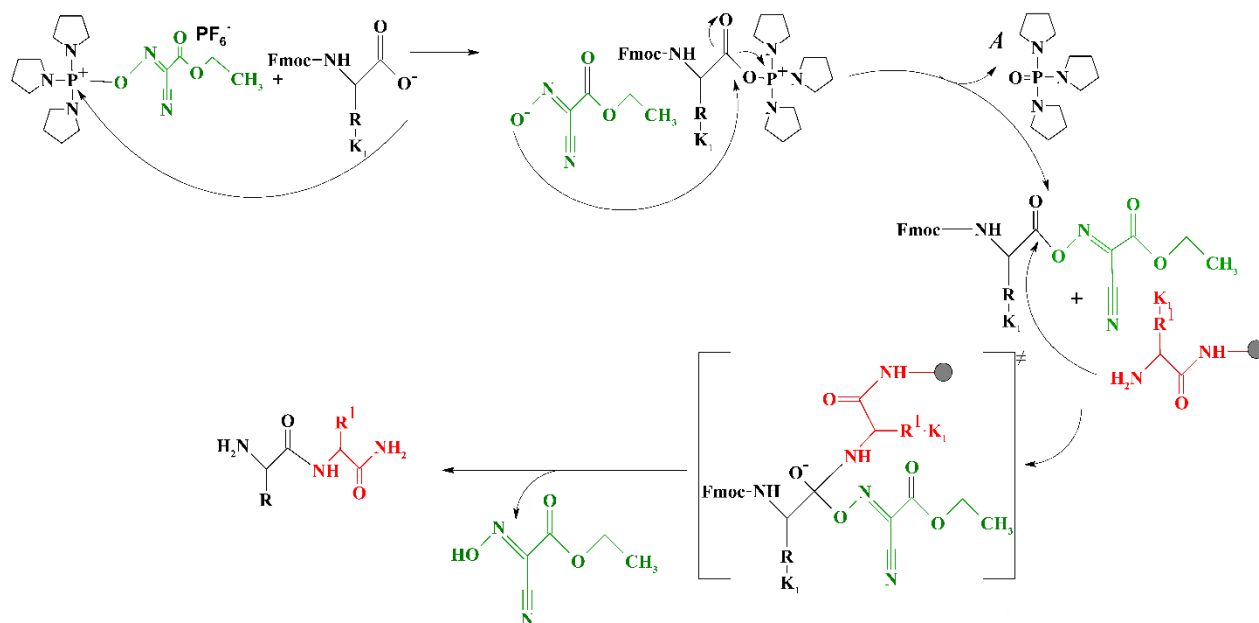
Suur osa fosfooniumi sooladest põhinevad HOBt-il ja HOAt-il, lisaks on välja töötatud ka Oxyma-rühmal põhinevad aktivaatorid. Oxyma lahkuvat rühma sisaldava aktivaatori kasutamine tagab head saagised ja madala ratsemisatsiooni nagu bensotriasoolidel põhinevad aktivaatorid, kuid on odavam ja efektiivsem alternatiiv [13,24]. Erinevalt bensotriasoolidest ei ole Oxyma-rühm plahvatusohtlik, mis teeb käsitlemise mugavamaks ja ohutumaks [13,14,25].

Fosfooniumi soolade hulka kuuluvatest aktivaatoritest on tahke faasi sünteesi läbiviimiseks üks primaid PyOxim (Skeem 4), mis sisaldab Oxyma-rühma.



Skeem 4. PyOxim-i struktuur

Esimest korda mainiti seda aktivaatorit 2003. aastal, kuid selleks hetkeks ei olnud veel põhjalikke uuringuid tehtud [26]. Nüüdseks on teada, et PyOxim-is sisalduv kõrge polaarsusega Oxyma-rühm tagab hea lahustuvuse tahke faasi peptiidisünteesis kasutatavas solvendis DCM. Reaktsiooni käigus tekkivad vesilahustuvad kõrvalproduktid on kergesti eemaldatavad [24]. Atsüülimisreaktsiooni iseloomustav mehhanism reagentiga PyOxim on toodud Skeemil 5. Aminohappe aktiveerimise edasiviivaks jõuks fosfooniumi sooladega on vastava oksiidi teke (Skeemil 5 ühend A) [15].



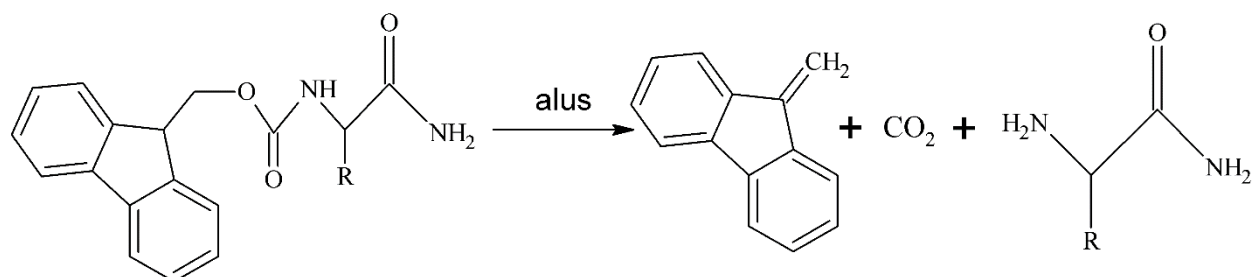
Skeem 5. Peptiidisünteesi atsüülimisreaktsiooni mehhanism reagentiga PyOxim, kus R/R₁ on külgrühmad, K₁ on külgrühma kaitserühm ning ● - tahke kandja.

1.1.2 Kaitserühmad

Peptiidisünteesi soovitud suunas kulgemiseks kasutatakse aminohapete funktsionaalrühmade kaitsmiseks kaitserühmi. Eristatakse ajutisi ning püsivaid kaitserühmi. Ajutised kaitserühmad kaitsevad aminohappe amino- ja karboksüülrühma ning peavad üksteisest sõltumata lahkuma ehk olema selektiivsed, sest need võetakse maha peale igat aminohappe sidumise etappi, et uue aminohappe aktiveeritud karboksüülrühm saaks sidestuda [11]. Kui jätta aminohappe N-terminaalne ots kaitsmata, võib toimuda polümerisatsioon, mille tulemuseks halveneb saagis või reaktsioon katkeb täielikult [10]. Püsivaid kaitserühmi kasutatakse kõrvalreaktsioonide vältimiseks aminohapetes, mille külgrühmad võivad hakata siduma aktiveeritud aminohapet (nt Ser, Thr, Tyr

jne). Need rühmad on peptiidi küljes terve peptiidisünteesi jooksul ja võetakse maha viimases etapis koos tahke kandjaga tugevalt happelises keskkonnas [10].

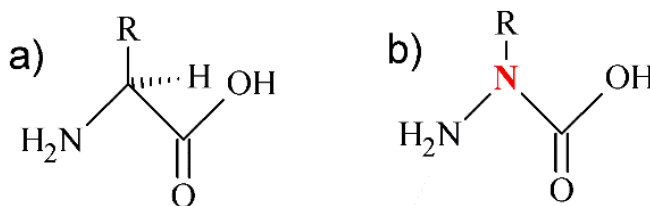
Aminohappe kaitsmiseks kasutatakse kahte meetodit: Fmoc/tBu ja Boc/Bn. Boc/Bn meetodil on vaja tugevaid happelisi tingimusi nii püsiva kui ka ajutiste kaitserühmade eemaldamiseks, mis võib olla kahjulik peptiidile (võib laguneda), eriti pikkade peptiidahelate puhul. Fmoc derivaatide reaktsioonivõime on sobilik polüamiidil põhinevale tahke faasi sünteesile [27]. Fmoc-rühma eemaldamiseks (Skeem 6), mis kaitseb aminohappe N-terminaalset otsa, on vaja aga pehmet aluselist keskkonda.



Skeem 6. Fmoc-rühma mahavõtmine aminohappe N-terminaalsest otsast

1.2 Asa-peptiidid. Tahke faasi asa-peptiidisüntees.

Asa-peptiidid on peptiidi analoogid, kus üks või enam α -süsinikku peaahele on asendatud lämmastikuga (Skeem 7) muutes molekuli geomeetriat tetraeedrilisest trigonaal-planaarseks [4].



Skeem 7. a) aminohape, b) asa-aminohape

Selline muutus struktuuris mõjutab aine keemilisi ja biokeemilisi omadusi. Hüdrasiinidel põhinevad asa-peptiidid on peptidomimeetikud ehk need on ühendid, mis oma omaduste poolest jäljendavad peptiide. Lisaks looduslike bioloogiliste omaduste säilitamisele on mimeetikud töötatud välja selleks, et tõsta peptiidi biosaadavust, kiirendada metabolismi ning suurendada selektiivsust retseptorite suhtes [28,29]. Esimene uurimus asa-peptiidide bioloogilise aktiivsuse kohta avaldati 1963. aastal [1]. Bioloogiliselt aktiivsete peptiidide asa-analoogide aktiivsus on

pikaajalisem, kui peptiididel, kuna elusorganismis puuduvad asa-peptiidsidet efektiivselt lagundavad ensüümid [2,3,16]. Asa-peptiidside on märgatavalt vastupidavam degradatsioonile peptidaaside α -kümütrüpsiini [3,28] ja subtilisiini [3] poolt võrreldes peptiidsidemega. Asa-peptiidid on nt potentsiaalsed hepatiidi, AIDSi ja SARSi ravimiseks ning leevendamiseks kasutatavate preparaatide kandidaadid [31].

Kuigi väidetakse, et peptiidikeemia on sarnane asa-peptiidikeemiaga [8], ei ole neid võimalik erinevalt peptiididest automatiseeritult sünteesida. Selle peamiseks põhjuseks on, et asa-aminohappe prekursoritena kasutatavad hüdrasiini derivaadid ei ole nende ebapüsivuse tõttu kommertsiaalselt kättesaadavad. Samuti on tahke faasi peptiidisünteesi meetodil valmistatud asa-peptiidide saagised madalad ja ei võimalda polümeeri sünteesi. Seetõttu on vaatamata suurele huvile asa-peptiidide vastu ravimitööstuses nende omadusi vähe uuritud.

Asa-peptiidisüntees koosneb tavaliselt hüdrasiini keemiast ja peptiidisünteesist. Nende sünteesimiseks kasutatakse kõige enam kahte meetodit [2]. Esimeses muudetakse tahkele kandjale kinnitatud peptiidi vaba N-terminaalne ots aktiivseks isotsüanaadiks. Seejärel viiakse läbi reaktsioon vajaliku asa-aminohappe prekursoriga, mida valmistatakse kasutades vastavat alküülhüdrasiini, mille teine N-aatom on kaitstud. Teiseks meetodiks on hüdrasiinse prekursori ja trifosgeeni vahelise reaktsiooni käigus saadud kloroatsüül derivaadi sidumine peptiidi/aminohappe N-terminaalse otsaga [2]. Paljude looduslike α -aminohapete asa-analoogide prekursorite sünteesimeetodite mugavdamise ja modifitseerimisega tegeleb meie töögrupist oma doktoritöö raames A. Mastitski, millest on ilmunud ka mitmeid publikatsioone [32–35].

Asa-aminohappele järgmise aminohappe külge sidumiseks kasutatakse enamasti tahke faasi peptiidisünteesi meetodikat (Skeem 2) [30,36]. Reaktsioonid kulgevad aga aeglaselt ja on madalate saagistega võrreldes peptiidisünteesiga. Peptiidisünteesis atsüülitakse järgmise aminohappe poolt peptiidi aminorühm, kuid asa-peptiidi korral toimub alküülamiini atsüülimise asemel semikarbasiidse $\text{NH}_2\text{-NR-C(O)}$ osa atsüülimine. Nende kahe N-aatomi nukleofiilsus on aga erinev [37,38]. α -aminohapete ja nende asa-derivaatide aminorühmade erinevat reaktsioonivõimet võib teoreetiliselt põhjendada ka nukleofiilsusparameetritega $N=13.85$ (s_N 0.53) ja $N=11.05$ (s_N 0.52), mis on vastavalt metüülamiini ja semikarbasiidi kohta toodud Mayr'i andmebaasis [7].

Asa-peptiidisünteesiks tahkel kandjal on katsetatud ka teisi meetodeid. Üheks selliseks on sünteesi läbiviimine mikrolainete abil. Antud meetodi optimeerimine võimaldaks teha automatiseeritud asa-peptiidisünteesi [4].

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töös kasutatud reaktiivid

Aine	M, g/mol	Puhtus, %	Tootja
BTC	296,75	-	Merck
DCM	84,93	≥99,9	Sigma-Aldrich
Dietüüleeter	74,12	99,90	Lach-Ner
DiPEA	129,25	≥98	Fluka
DMF	73,09	≥99,8	Sigma-Aldrich
Fmoc-L-Ala-OH*H ₂ O	329,33	-	Iris Biotech
Fmoc-Amiid MBHA vaik	-	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Phe-OH	387,4	-	Iris Biotech
HOBt	135,12	≥97,0	Sigma-Aldrich
Piperidiin	85,15	99	Sigma-Aldrich
PyOxim	527,38	≥97,5	Sigma-Aldrich
TBTU	321,09	-	Iris Biotech
TIS	158,36	99%	Sigma-Aldrich
TFA	114,02	99%	Sigma-Aldrich
FmocNHNHCH ₃	268,3	Kontrollitud ja määratud TLC ning TMR-iga	Sünteesitud A. Mastitski poolt

2.2 Aparatuur ja töövahendid

Proovid analüüsiti Shimadzu LCMS-2020 kromatograafil 220 nm juures. HPLC seade oli varustatud Kinetex 5 µM EVO kolonniga (C18, 100 Å, 250 x 4.6 mm). Proovide voolutamiseks kasutati järgmist gradiendi programmi: puhver B 5-30%, kus puhver A oli 0.1% TFA/Milli-Q ja puhver B oli 0.1% TFA/ACN. Proove voolutati 20 min jooksul voolukiirusel 1 ml/min. Proovid süstiti 3. minutil ning andmete töötlemiseks kasutati programmi LabSolutions Version 5.82 SP1. Arvutuste läbiviimiseks kasutati programmi GraphPad 5 Version 5.04.

2.3 Sünteeside kirjeldused

2.3.1 Fmoc-Phe-NH-vaik ja Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik sünteesid

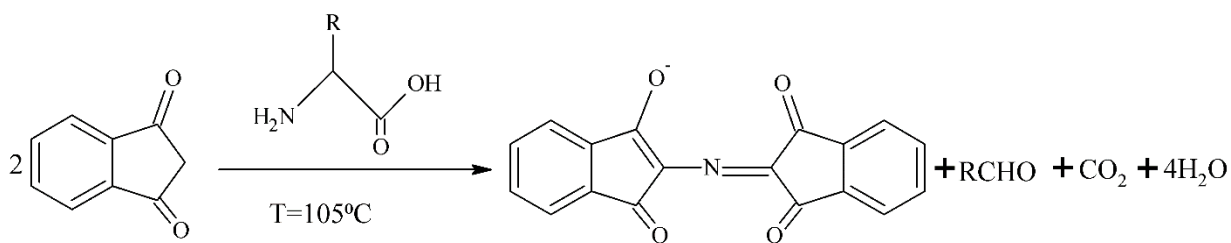
Peptiidi sünteesimiseks kasutatavasse 20 ml filterkolonni kaaluti 0,34 mmol (1 ekv) Fmoc-amiid MBHA vaiku (0,68 mmol/g), lisati DCM ja lasti 20 min punduda. Seejärel eemaldati vaigult Fmoc-rühm 20% piperidiini lahusega DMF-is. Kaitserühma jäägid pesti välja kahe solvendiga - DMF (5 korda) ja DCM (1 kord). Vabade aminorühmade olemasolu kontrollimiseks tehti Kaiseri ja TLC testi (vt punkti 2.3.2), vajadusel korrati eelnevat etappi või jätkati sünteesi. Fmoc-Phe-OH või Fmoc-Ala-OH (3 ekv) ning karboksüülrühma aktiveerimiseks kasutatavad reagentid TBTU (3 ekv) ja HOBt (3 ekv) lahustati DMF-is. Aluselise keskkonna saamiseks lisati DiPEA (8 ekv) ning segati omavahel kokku. Saadud lahus viidi kolonni kaitsmata vaigule, kus atsüülimisreaktsioonil lasti toimuda 1 h. Aminohappe külge minemist polümeerile kontrolliti ninhüdrin testiga ning vajadusel korrati atsüülimise etappi [12]. Reagentide ülehelga ja kõrvalproduktide eemaldamiseks teostati pesemisprotseduur: DMF (3 korda), DCM (3 korda), DMF (3 korda). Järgmise aminohappe külge sidumiseks korrati kaitserühma eemaldamise ja atsüülimise etappe.

2.3.2 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine

Peptiidi õige järjestuse ja võimalikult suure saagise tagamiseks kontrolliti atsüülimisreaktsiooni vaheetappe Kaiseri värvitesti ja TLC testi abil.

Kaiseri testi korral reageerivad kaks ninhüdrini molekuli aminohappe kaitsmata N-rühmaga ning selle reaktsiooni käigus tekkiv ühend N-dininhüdrin annab vaiguteradele sinise (Ruhemann'i lilla [39]) värvuse (Skeem 8). Positiivne test – tumesinine, negatiivne test – kollane. Test töötab üldjuhul hästi primaarsete amiinidega, sekundaarsete aminohapete jaoks ei ole see alati usaldusväärne [39,40].

Kvalitatiivne Kaiseri test [41]: Väike kogus (1-2 mg) pestud vaiku kanti katseklaasi, lisati 2-3 tilka lahust A (83,5% fenooli lahus puhtas EtOH-s, millele on lisatud 1,3% KCN lahust piperidiinis) ja B (5% ninhüdrini lahus EtOH-s). Soojendati 5 min temperatuuril 105 °C. Jälgiti vaiguterade värvuse muutust.



Skeem 8. Ninhüdrüini reaktsioonimehhanism kaitsmata aminohape N-terminaalse otsaga, kus R on külgrühm.

Atsüülimisreaktsiooni kulgemist jälgiti ka TLC testi abil. Reaktsiooni käigus Fmoc-rühma mahavõtmisel tekkivad kõrvalproduktid (dibensofulveen ja selle derivaat) on fluorestseeruvad UV-kiirguses. Mida intensiivsem oli laik seda rohkem sisaldas pesulahus kõrvalprodukte, mis võimaldas teha järelduse, et aminohape oli eelnevas etapis seostunud. Asa-peptiidsideme tekkimise jälgimiseks kasutati ainult TLC fluoresteerumistesti, kuna hüdrasinorühm ei reageeri ninhüdrüiniga.

Kvalitatiivne TLC test: Fmoc-kaitserühma mahavõtmise etapil kanti mõned tilgad pesulahust TLC silikageeli plaadile. Laigud kuivatati ja visualiseeriti UV valguse all lainepikkusel 254 nm. Jälgiti laikude intensiivsust.

2.3.3 Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik süntees

Kuivatatud 50 ml ümarkolbi kaaluti vajalik kogus FmocNHNHCH₃ (4 ekv) ning varustati Ar-ga täidetud õhupalliga. Kolbi lisati kuiva DCM-i kuni sademe lahustumiseni ning aluselise keskkonna tagamiseks DiPEA (8 ekv). Kolbi jahutati jäävannis. Kaaluti BTC (1.32 ekv), lahustati kuivas DCM-s ja viidi ümarkolbi. Saadud lahust segati jäävannil 30 min. Jahutamine, kuiva solvendi ja inertgaasi kasutamine on vajalik eksotermilise lagunemisreaktsiooni ja kõrvalproduktide tekkimise ära hoidmiseks. Seejärel aurutati DCM argooni voolus, et eemaldada lenduvad kõrvalproduktid. Kolbi alles jäänud suspensioon lahustati minimaalses koguses kuivas DCM-s. Eelnevalt punktis 2.3.1 kirjeldatud eeskirja järgi valmistatud Fmoc-Phe-NH-vaigult eemaldati kaitserühm (samas punktis kirjeldatud eeskirja järgi) ning lisati DiPEA (8 ekv). Ümarkolvis valmistatud reagent viidi kolonnis olevale vaigule. Reaktsioonil lasti toimuda 2-3 h. Asa-peptiidsideme tekkimist kontrolliti TLC testiga. Reagentide ülehelgla ja kõrvalproduktide eemaldamiseks teostati pesemisprotseduur: DMF (3 korda), DCM (3 korda), DMF (3 korda).

2.3.4 Kineetilised mõõtmised

Kineetiliste mõõtmiste läbiviimiseks kasutati meie töögrupis hiljuti välja töötatud meetodit [42]. Alustuseks kaaluti punktides 2.3.1 ja 2.3.3 kirjeldatud eeskirjade järgi sünteesitud Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik või Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik (0,0408 mmol, 1 ekv). Esimese etapina eemaldati kaitserühm punktis 2.3.1 kirjeldatud eeskirja järgi. Lisati 6 ml DMF-i ning termostateeriti 25 °C juures. Järgnevalt kaaluti 10 ekv Fmoc-Ala-OH ja 10 ekv PyOxim ning lahustati need 4 ml DMF-s. Aluselise keskkonna saamiseks lisati 20 ekv DiPEA. Aminohape, aktivaator ja alus segati kokku ning eelaktiveeriti 2 min [14]. Seejärel lisati lahus atsüülimisreaktsiooni alustamiseks H-Ala-Phe-NH-vaigu segule. Reaktsiooni kineetika jälgimiseks võeti segust 500 µl proovid kindlate ajavahemike tagant. Saadud proovid viidi filtriga varustatud süstlasse, mis reaktsiooni koheseks peatamiseks pesti : DMF-ga (3 korda), DCM-ga (3 korda), DMF-ga (3 korda). Seejärel eemaldati tekkinud Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH-vaigult või Fmoc-Ala-Ala-Phe-NH-vaigult kaitserühm. Püsivate kaitserühmade ning tripeptiidi maha võtmiseks tahkelt kandjalt lisati sellele tugevalt happelist lahust (95% TFA; 2,5% Milli-Q; 2,5% TIS) ning reaktsioonil lasti toimuda 2 h. Seejärel aurutati õhuvoolus TFA jäägid ning proovi ekstraheeriti ja tsentrifugeeriti 3 korda dietüüleetri, mille käigus eemalduvad eetris lahustuvad kõrvalproduktid. Lõplikest solvendi jääkidest lahti saamiseks asetati proov vähemalt 2-3 h lüofilisaatorisse. Saadud toorpeptiide analüüsiti LC-MS kromatograafia, kus määrati tripeptiidi ja reageerimata jäänud dipeptiidi suhe.

2.3.5 Kineetiliste andmete analüüs

Antud meetod võimaldas samaaegselt reaktsiooni produkti (tripeptiidi) ja allesjäänud lähteaine (dipeptiidi) määramist igas proovis. Seetõttu oli otstarbekas kirjeldada tripeptiidi moodustumise protsessi kasutades parameetrit Y, mida arvutati dipeptiidi ja tripeptiidi piikide pindalade järgi samalt kromatogrammilt (vt LISA lk 31, 33):

$$Y = \frac{S_{\text{dipeptiid}}}{S_{\text{dipeptiid}} + S_{\text{tripeptiid}}}$$

Dipeptiide ja tripeptiide iseloomustavate piikide asukoha kindlaks tegemiseks kasutati MS-i (vt LISA lk 32, 34).

Kasutades arvutamistel ühe ja sama eksperimendi tulemusi vähendati sellega proovi kogumisest ja töötlemisest tulenevaid vigu. Parameeter Y näitab, kui palju lähteainet on jäänud reaktsiooni segusse alles ja sellest tulenevalt 1-Y näitab produkti saagist.

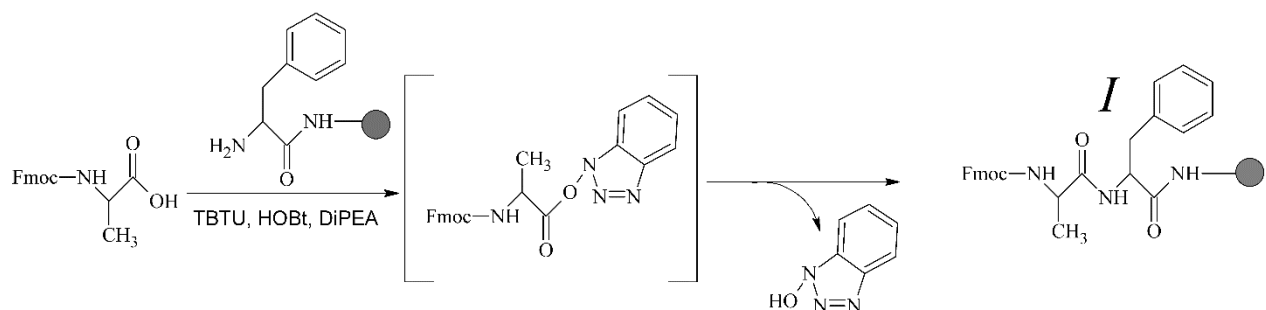
Reaktsiooni kiirus määrati parameetri Y ja aja vahelisest sõltuvusest. Kuna atsüülimisreaktsiooni läbiviimiseks kasutatialaniini 10 kordses koguses ülehulgas võrreldes vaigu kogusega, saab protsessi kirjeldada esimest järku kiiruse võrrandiga:

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

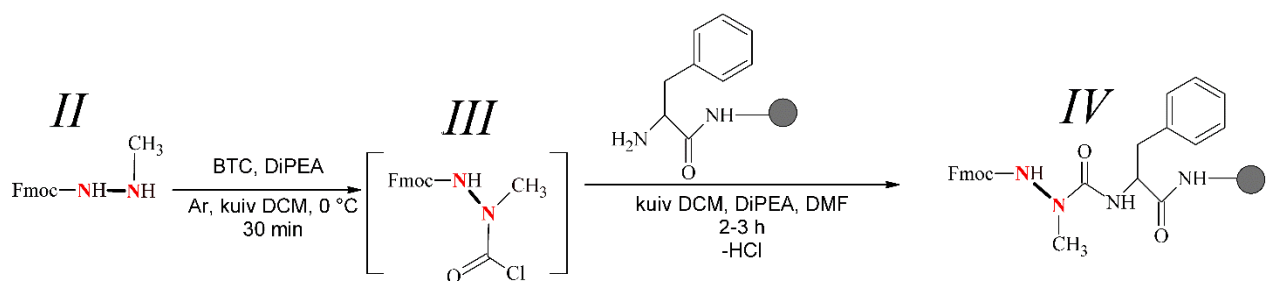
kus k_{obs} on esimest järku kiiruskonstant, t on aeg (min), Y_{∞} platoo väärtus iseloomustab atsüülimisreaktsiooni lõppu ja $1 - Y_{\infty}$ näitab reaktsiooni saagist. Kineetilisi andmeid analüüsiti kasutades programmi GraphPad Prism 5.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Käesolevas töös sünteesiti mudelpeptiidid: H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂. Esmalt sünteesiti kaks dipeptiidi Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik **I** ja Fmoc-asaAla-Phe-NH-vaik **IV**, vastavalt reaktsiooni Skeemidele 9 ja 10.



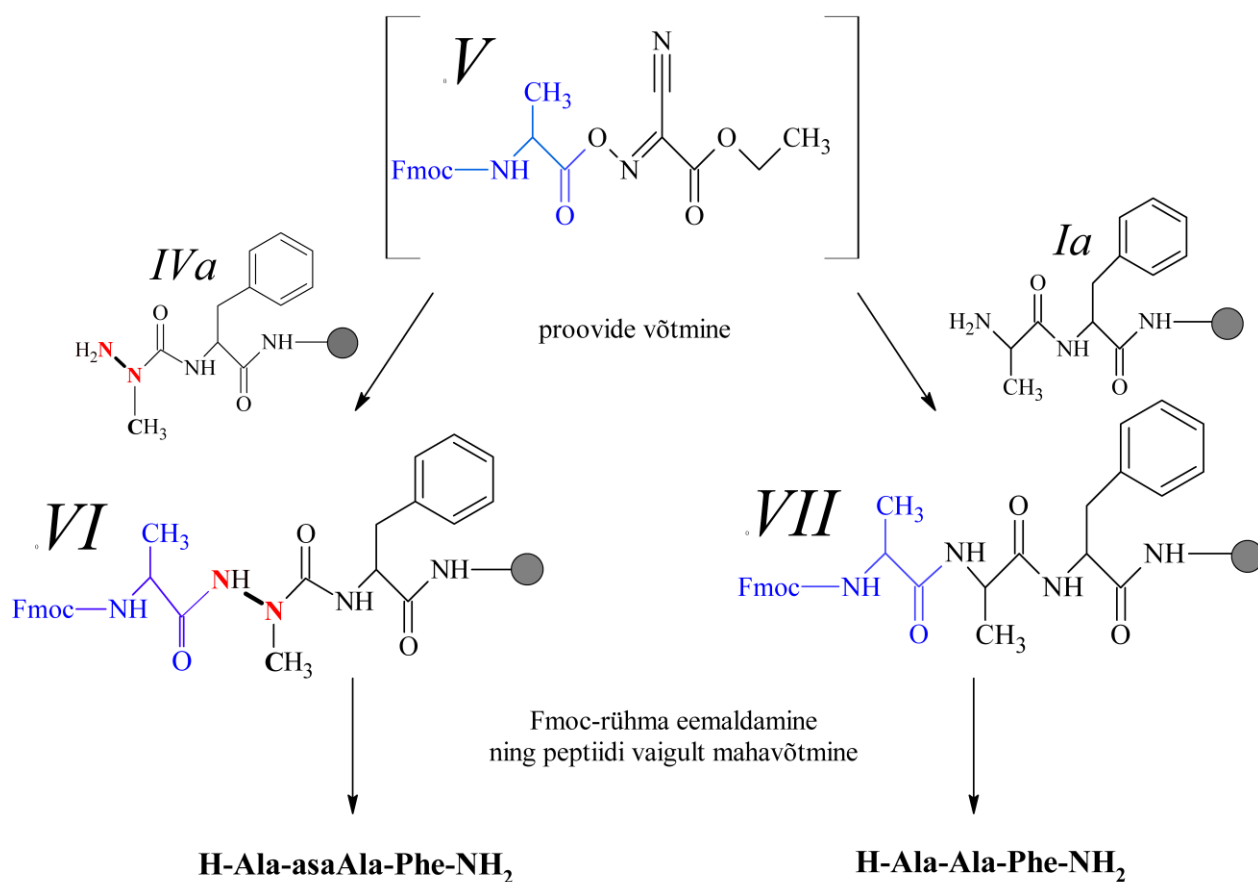
Skeem 9. Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik süntees



Skeem 10. Fmoc-Ala-Phe-NH-vaik süntees

Mudelpeptiidid koosnesid samadest aminohapetest ning olid samasuguse järjestusega, kuid peptiidis **IV** asendatialaniin asalaniiniga **III**, kasutades asa-aminohappe prekursorina Fmoc kaitstud metüül hüdrasiini **II**.

Kõige kriitilisem etapp asa-peptiidi (Skeem 11) **VI** sünteesis on asa-peptiidsideme moodustumine, kus toimub aktiveeritudalaniini **V** liitumine asa-peptiidi **IVa** hüdrasino-terminaalsele otsale. Peptiidi **VII** sünteesis toimub selle asemel aminohappe liitumine dipeptiidi **Ia** amino-terminaalsele otsale. Selles etapis viidi läbi detailne kineetiline uurimus, et võrrelda omavahel peptiid- ja asa-peptiidsideme tekkimist kasutades atsüülimisreaktsiooni teostamiseks PyOxim-iga aktiveeritudalaniini **V**, mille aktiveerimismehhanismi võib vaadata Skeemilt 5.

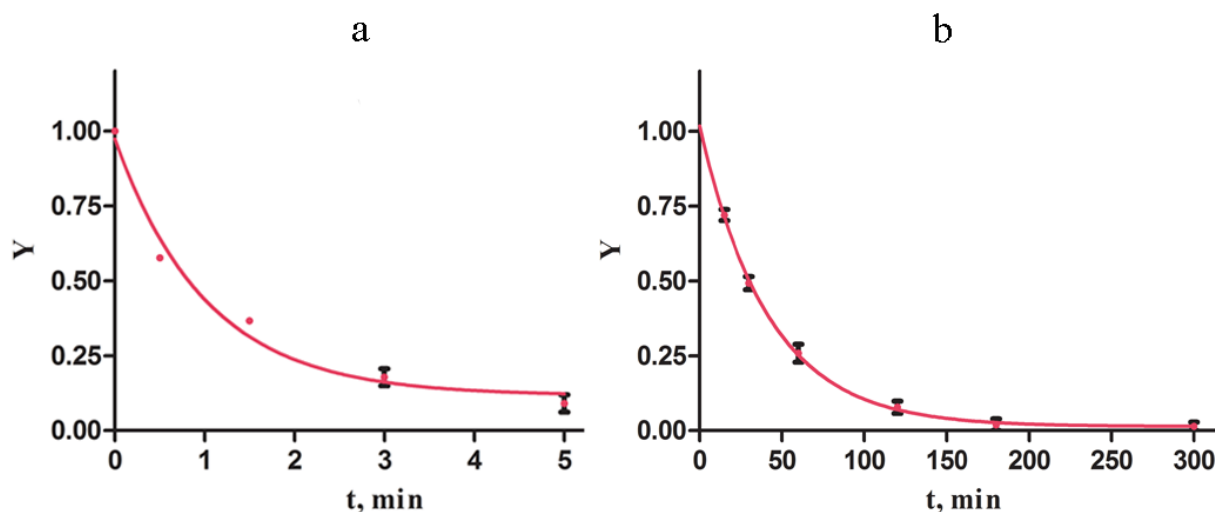


Skeem 11. H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ ja H-Ala-Ala-Phe-NH₂ süntees, kus *Ia* ja *IVa* on kaitsmata dipeptiidid *I* ja *IV*.

Asa- ja peptiidsideme moodustumise kineetikat mõõdeti DMF-s 25 °C juures. Reaktsioonid viidi läbi samade reagentide koguste ja DMF hulga (10 ml), et kontsentratsioonid ei muutuks. Saadud toorpeptiide analüüsiti LC-MS meetodil, kus määrati tekkinud tripeptiidi ja reageerimata jäänud dipeptiidi piikide pindalade suhe erinevatel ajamomentidel ning arvutati reaktsiooni esimest järku kiiruskonstandid (Tabel 1). Vastavad kineetilised kõverad on toodud Joonisel 1.

Tabel 1. PyOxim-iga aktiveeritud Fmoc-Ala-OH ja H-asaAla-Phe-NH-vaik või H-Ala-Phe-NH-vaik vahelise reaktsiooni esimest järku kiiruskonstandid (k_{obs} , min^{-1}) DMF-is 25 °C juures.

Mudelveptiid	k_{obs} , min^{-1}	R^2
H-Ala-Ala-Phe-NH ₂	$0,980 \pm 0,15$	0,979
H-Ala-asaAla-Phe-NH ₂	$0,0239 \pm 0,002$	0,989



Joonis 1. PyOxim-iga aktiveeritud Fmoc-Ala-OH ja (a) H-Ala-Phe-NH-vaik või (b) H-asaAla-Phe-NH-vaik vahelise reaktsiooni kineetilised kõverad DMF-is 25 °C juures.

Peptiidiga viidi läbi kaks ja asa-peptiidiga kolm paralleelmõõtmist. Jooniselt 1 ja Tabeli 1 R^2 väärtustest on näha, et kineetilised kõverad korreleeruvad paremini asa-peptiididega teostatud reaktsioonide korral. See on tingitud ilmselt sellest, et proovide võtmine reaktsioonisegust ning reaktsiooni peatamine toimus käsitsi. Reaktsioon peptiidiga on aga väga kiire ja mõõtmisvead selle tõttu suuremad. Jooniselt 1 on näha, et atsüülimisreaktsioonid mõlema vaigule seotud dipeptiidiga (a) ja (b) kulgevad vaadeldava aja jooksul praktiliselt lõpuni. Peptiidisünteesi korral on reaktsiooni poolestusaeg 42 s. See tulemus on kooskõlas ka kiire Fmoc SPPS sünteesi protokolliga, kus aminohappe sidestumine peptiidiga toimub toatemperatuuril 2-5 min jooksul [43,44]. Tabelis 1 toodud k_{obs} väärtusest on aga näha, et asa-peptiidi moodustumisreaktsiooni poolestusaeg on ligikaudu 40 korda pikem. Seda on selgesti näha ka Joonisel 1 toodud reaktsiooni kineetiliste

kõverate (a) ja (b) ajaskaalade erinevusest. Need andmed näitavad, et asa-peptiidside tekib peptiidsidemega võrreldes palju aeglasemalt. Seetõttu võib öelda, et tahke faasi peptiidisünteesi protokoll ei saa otseselt rakendada asa-peptiidside sünteesiks ilma oluliste muudatusteta. Selleks oleks vaja aktivaatoreid, mis suurendaks aktiveeritud aminohappe reaktsioonivõimet, et muuta asa-peptiidside sünteesis asa-aminohappe semikarbaadi osa atsüülimist efektiivsemaks.

4. KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli võrrelda peptiid- ja asa-peptiidsideme moodustumist mudelpeptiidides H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kasutades tahke faasi peptiidsünteesi meetodit. Mõlema reaktsiooni tulemusena saadi peaaegu täielikult atsüleerunud vaigu külge kinnitatud peptiid või asa-peptiid. Asa-peptiidsideme süntees aminohappe aktiveerimisel aktivaatoriga PyOxim oli palju aeglasem võrreldes peptiidsideme moodustumisega. Tulemused näitavad, et tavalist SPPS protokollit ei saa rakendada otseselt asa-peptiidsünteesis. Aminohappe reaktsioonivõime suurendamiseks on vaja tõhusamaid aktivaatoreid, et saavutada asa-aminohappe semikarbasiidse osa efektiivsem atsüleerumine asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioonil.

SUMMARY

Peptides are widely used in medicine due to specificity against target sites as well as biocompatibility. Being biologically active reagents, peptides are well recognised by human body and decomposed very quickly. This is one of the reasons, why linear peptides have poor pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and in such case peptidomimetics, as aza-peptides, are used. They maintain the biological effect of the parent peptide, as well as remove undesirable properties. However, for aza-peptide synthesis, the aza-amino precursors are not commercially available. In addition, slow reaction and low yield of aza-peptide bond formation using solid-phase peptide synthesis method disables automatised synthesis of aza-peptide polymers.

The purpose of this work was to compare kinetically peptide and aza-peptide bond formation in model peptides H-Ala-Ala-Phe-NH₂ and H-Ala-asaAla-Phe-NH₂, respectively. Both reactions led to nearly complete acylations of the resin-linked aza-peptide and the conventional peptide. However, synthesis of aza-peptide bond was much slower than the one of common peptide bond, including when conventional coupling agent PyOxim was used for amino acid activation. These results demonstrate that the conventional SPPS protocol cannot be directly applied to aza-peptide synthesis and that new coupling agents are needed to increase the reactivity of the activated amino acid in order to achieve effective acylation of the semicarbazide moiety during the aza-peptide bond formation reaction.

KASUTATUD KIRJANDUS:

1. 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.
2. 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.
3. G, L. C.; Gupton, B. F.; Carroll, D. L.; Tuhy, P. M.; Kam, C.; Powers, C. Reaction of Azapeptides with Chymotrypsin-like Enzymes. **1984**, No. 1967.
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. 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.
6. Chingle, R.; Ratni, S.; Claing, A.; Lubell, W. D. Application of Constrained Aza-Valine Analogs for Smac Mimicry. **2016**, 106 (3), 235–244.
7. *Mayr's Database Of Reactivity Parameters*;
<http://www.cup.lmu.de/Oc/Mayr/Reaktionsdatenbank/> viimati alla laetud 01.05.2017.
8. Trabocchi, A.; Guarna, A. Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry. The Art of Transforming Peptides in Drug; John Wiley & Sons, 2014; p. 31.
9. Tymoczko, J. L.; Berg, J. L.; Stryer, L. Biokeemia Lühikursus; TTÜ kirjastus: Tallinn, 2016; pp 35–50.
10. Carey, F. A.; Giuliano, R. M. Orgaaniline Keemia; TTÜ kirjastus: Tallinn, 2014; pp 1116–1155.
11. Jakubke, H.-D.; Jeschkeit, H. Аминокислоты, Пептиды, Белки.; «Мир»: Москва, 1985; pp 89–97.
12. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149.
13. Jad, Y. E. S.; Khattab, S. N.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxime-Based Carbonates as Useful Reagents for Both N-Protection and Peptide Coupling. *Molecules* **2012**, 17 (12), 14361–14376.

14. Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. PyOxP and PyOxB: The Oxyma-Based Novel Family of Phosphonium Salts. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (16), 3665–3673.
15. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
16. Sheehan, J.; Hess, G. A New Method of Forming Peptide Bonds. (Carbodimide). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1955**, No. 77, 1067–1068.
17. Sheehan, J.; Hess, G. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
18. Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem Soc Rev* **2009**, *38* (2), 606–631.
19. Kamiński, Z. J.; Kolesińska, B.; Kolesińska, J.; Sabatino, G.; Chelli, M.; Rovero, P.; Błaszczuk, M.; Główska, M. L.; Papini, A. M. N-Triazinylammonium Tetrafluoroborates. A New Generation of Efficient Coupling Reagents Useful for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (48), 16912–16920.
20. 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.
21. Li, P.; Xu, J. C. 5-(1H-benzotriazol-1-yloxy)-3,4-dihydro-1-methyl-2H-pyrrolium Hexachloroantimonate (BDMP): A Highly Efficient Immonium Type Peptide Coupling Reagent. *Chem. Lett.* **1999**, No. 11, 1163–1164.
22. Chen, M. F.; Benoiton, N. L. E. O.; Benoiton, N. L. E. O.; Chen, M. F.; Benoiton, N. L. E. O. Diisopropylethylamine Eliminates Dipeptide Formation during the Acylation of Amino Acids Using Benzoyl Chloride and Some Alkyl Chloroformates / I II. **1987**, 3–6.
23. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. Peptide Coupling Reagents. IV. N-[Oxytris(dimethylamino)phosphonium]benzotriazole Hexafluorophosphate. *Tetrahedron Lett.* **1975**, No. 14, 1219–1222.
24. Subirós-Funosas, R.; Khattab, S. N.; Nieto-Rodríguez, L.; El-Faham, A.; Albericio, F. Advances in Acylation Methodologies Enabled by Oxyma-Based Reagents. *Aldrichimica Acta* **2013**, *46* (1), 21–44.
25. El-Faham, A.; Subirós-Funosas, R.; Albericio, F. A Novel Family of Onium Salts Based upon Isonitroso Meldrum's Acid Proves Useful as Peptide Coupling Reagents. *European J. Org. Chem.* **2010**, No. 19, 3641–3649.
26. Hoffmann, F.; Jäger, L.; Griehl, C. Synthesis and Chemical Constitution of Diphenoxyphosphoryl Derivatives and Phosphonium Salts as Coupling Reagents for

- Peptide Segment Condensation. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **2003**, *178* (2), 299–309.
27. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino-Acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, *3* (13), 537.
 28. Tal-Gan, Y.; Freeman, N. S.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Metabolic Stability of Peptidomimetics: N-Methyl and Aza Heptapeptide Analogs of a PKB/Akt Inhibitor. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *78* (5), 887–892.
 29. Traoré, M.; Gignac, M.; Doan, N.-D.; Hof, F.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Chromobox Homolog 7 (CBX7) Ligands. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23* (4), 266–271.
 30. Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of Azapeptides by the Fmoc/tert-Butyl/Polyamide Technique. **1993**, 2843–2849.
 31. Bredihhin, A.; Mäeorg, U. Effective Strategy for the Systematic Synthesis of Hydrazine Derivatives. *Tetrahedron* **2008**, *64* (28), 6788–6793.
 32. Mastitski, A.; Niinepuu, S.; Haljasorg, T.; Järv, J. One-Pot Synthesis of Protected Alkylhydrazines from Acetals and Ketals. Scope and Limitations. *Org. Prep. Proced. Int.* **2015**, *47* (6), 490–498.
 33. Mastitski, A.; Haljasorg, T.; Kipper, K.; Järv, J. Synthesis of Aza-Phenylalanine, Aza-Tyrosine, and Aza-Tryptophan Precursors via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2015**, *64* (2), 168.
 34. Mastitski, A.; Kisseljova, K.; Järv, J. Synthesis of the Fmoc-Aza-Arg(Boc)₂ Precursor via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2014**, *63* (4), 438.
 35. Mastitski, A.; Järv, J. One-Pot Synthesis of Fmoc- and Boc-Protected Aza-Methionine Precursors from 2-Methylthioacetaldehyde Dimethyl Acetal. *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, *46* (6), 559–564.
 36. 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.
 37. Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 8142–8155.
 38. 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.

39. *Ninhydrin*; <https://en.wikipedia.org/wiki/Ninhydrin> viimati alla laetud 15.02.2017.
40. Lee, S.-W.; Lim, J.-M.; Bhoo, S.-H.; Paik, Y.-S.; Hahn, T.-R. Colorimetric Determination of Amino Acids Using Genipin from *Gardenia Jasminoides*. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480* (2), 267–274.
41. Kaiser, E.; Colescott, R. .; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Detection Solution and Method for Reaction Endpoint Monitoring of Solid Phase Polypeptide Synthesis, and Application in Bivalirudin Solid-phase Synthesis. **1970**, *34* (2), 595–598.
42. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**, Submitted
43. 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.
44. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis with HCTU. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14* (1), 97–101.

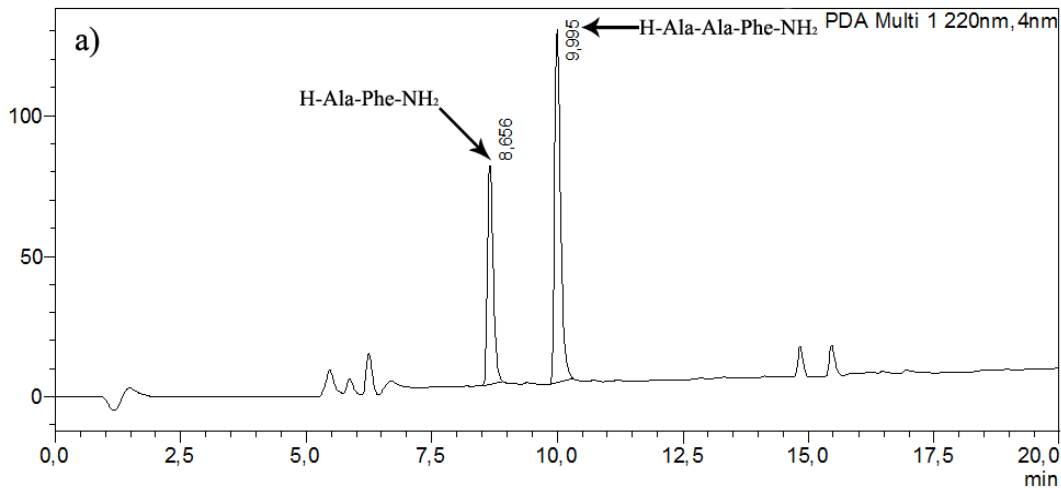
Tänuavaldus

Töö autor avaldab lugupidamist ja tänu enda juhendajatele Anu Ploomile (PhD) ja Meeli Arujõe (MSc), kes aitasid kaasa antud bakalaureusetöö valmimisele kõigi teadmistega.

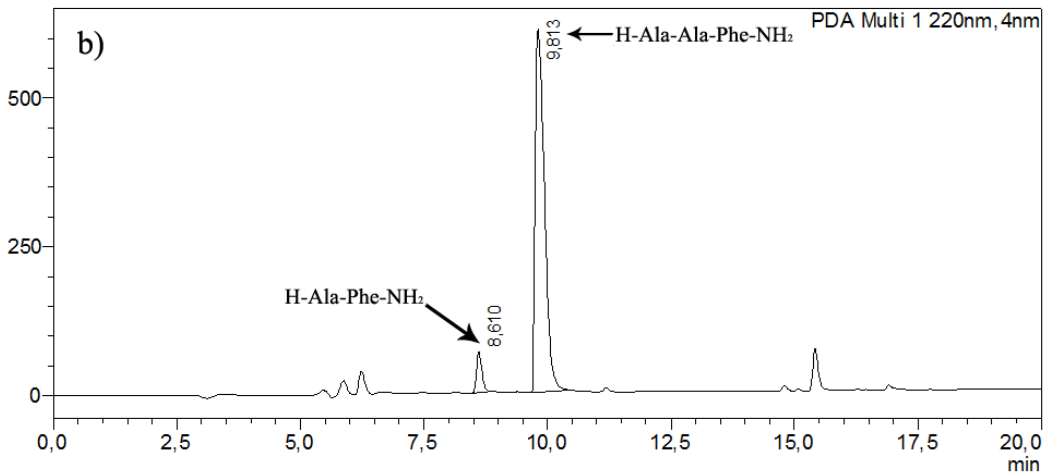
Lisaks tänatakse Anton Mastitskit (MSc) asa-peptiidsünteesi läbiviimiseks vajaliku prekursori sünteesimise eest.

LISA:

mAU

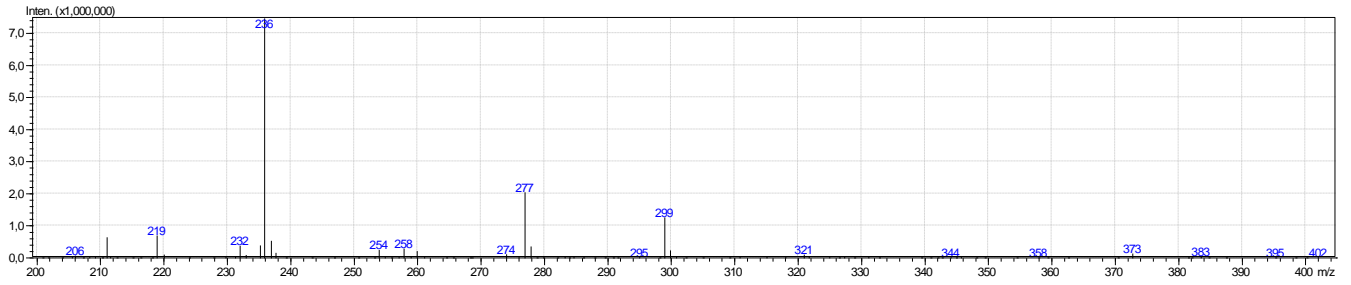


mAU

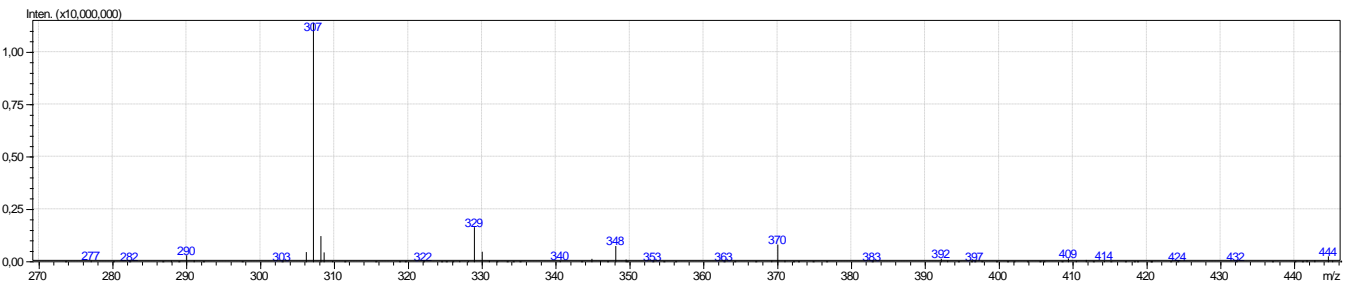


Mudelpeptiidide kromatogramm: Toorpeptiidide H-Ala-Phe-NH₂ ja H-Ala-Ala-Phe-NH₂ HPLC kromatogramm **a)** 1,5 minutil ning **b)** 5 minutil. Peptiidid lahustati 5% ACN-i vesilahuses. HPLC analüüsimiseks kasutati 5-30% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 20 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 3. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

c)

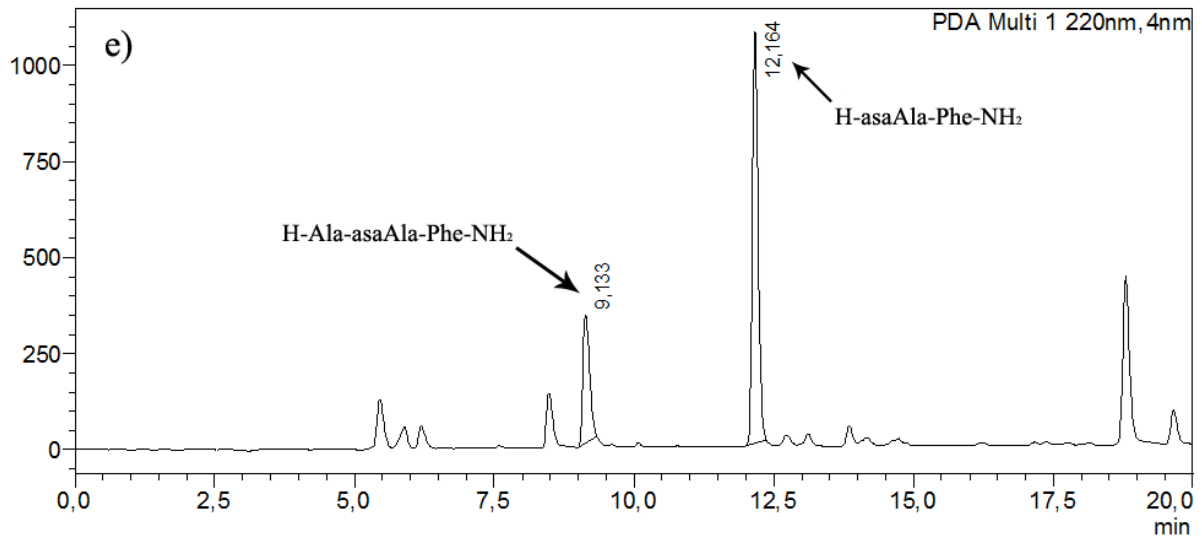


d)

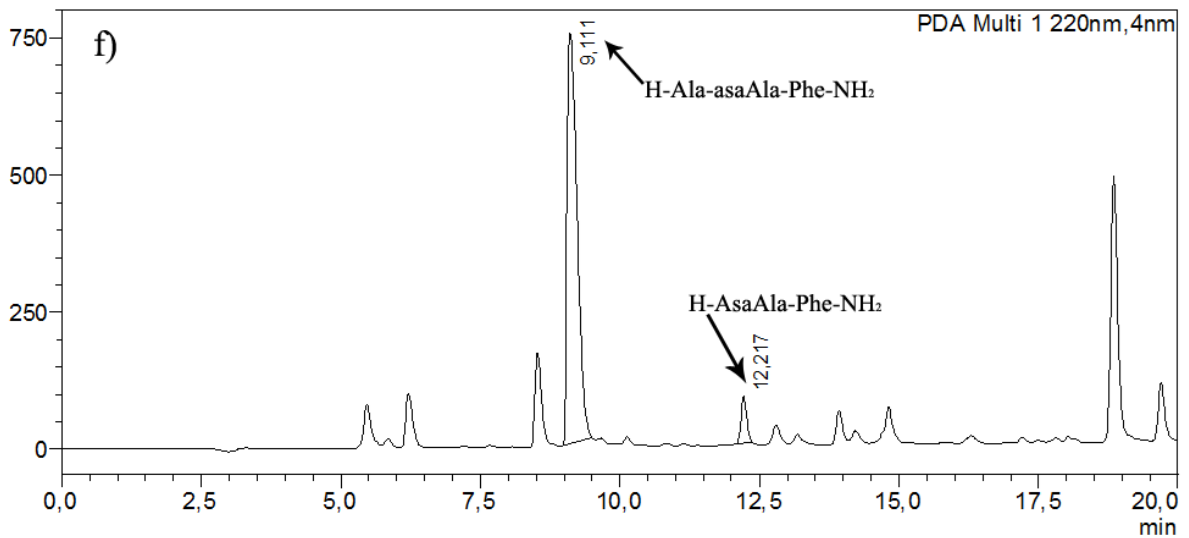


Mudelpeptiidide massispektrid: **c)** dipeptiid H-Ala-Phe-NH₂ ([M+H]⁺; [M+Na]⁺; [M+ACN+H]⁺; [M+ACN+Na]⁺) ja **d)** tripeptiid H-Ala-Ala-Phe-NH₂ ([M+H]⁺; [M+Na]⁺; [M+ACN+H]⁺; [M+ACN+Na]⁺) positiivses ionisatsiooni režiimis.

mAU

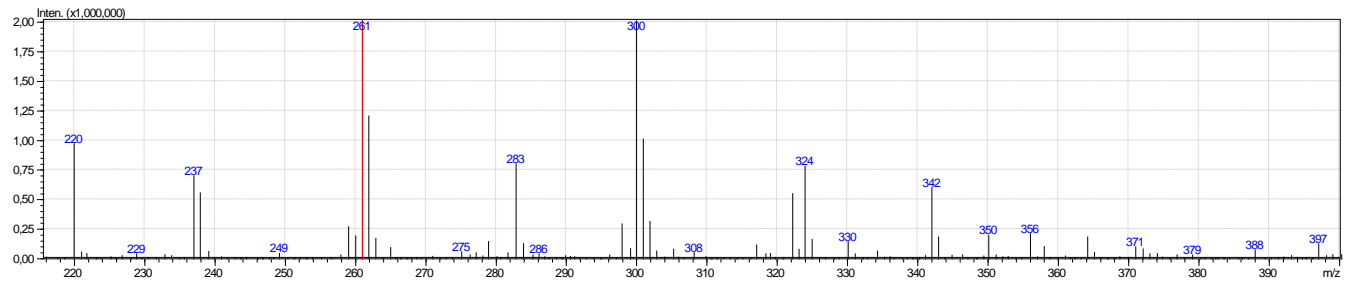


mAU

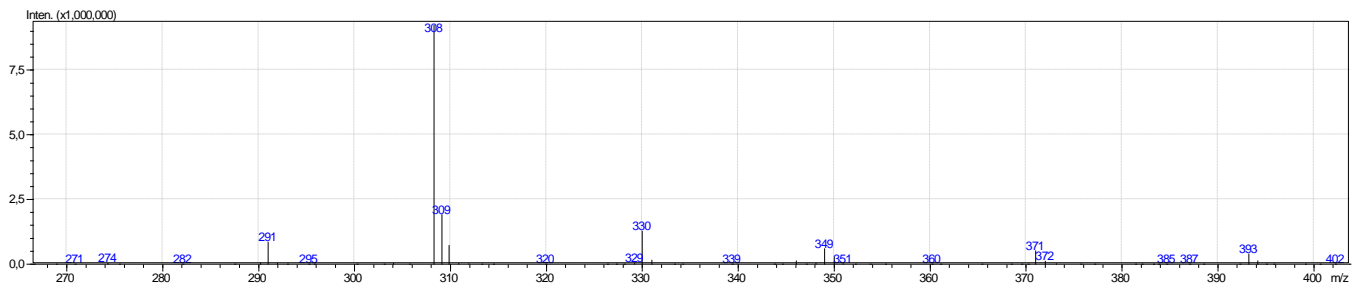


Asa-mudelpeptiidide kromatogrammid: Toorpeptiidide H-asaAla-Phe-NH₂ ja H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ HPLC kromatogrammid **c)** 15 minutil ning **d)** 180 minutil. Peptiidid lahustati 5% ACN-i vesilahuses. HPLC analüüsimiseks kasutati 5-30% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 20 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 3. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

g)



h)



Asa-mudelpeptiidide massispektrid: g) dipeptiid H-asaAla-Phe-NH_2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\text{M}+\text{K}]^+$; $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$) ja **h)** tripeptiid $\text{H-Ala-asaAla-Phe-NH}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\text{M}+\text{ACN}+\text{H}]^+$; $[\text{M}+\text{ACN}+\text{Na}]^+$ positiivses ionisatsiooni režiimis.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Alla Troska,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Peptiid- ja asa-peptiidsideme tekke kineetiline uurimus“,

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

- 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.

Tartu, **24.05.2017**