

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Orgaanilise keemia õppetool

Madis Palmet

Asa-arginiini sisaldava asa-peptiidi H-RasaRASVA-NH₂ süntees

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: Anu Ploom, PhD

Alla Troska-Palla, MSc

Rait Palla, MSc

Tartu 2024

INFOLEHT

Asa-arginiini sisaldava asa-peptiidi H-RasaRASVA-NH₂ süntees

Peptiidid on mitmetes eri valdkondades huvipakkuvad ühendid, kuid nende kasutamist ravimitena raskendavad halb membraanläbitavus ja väike metaboolne stabiilsus. Nende omaduste parandamiseks arendatakse peptidomimeetikuid. Asa-peptiidid on peptidomimeetikud, mille abil üritatakse eelkõige suurendada peptiidide metaboolset stabiilsust elusorganismides. Asa-peptiidide omadusi on aga uuritud vähe, kuna puuduvad efektiivsed meetodid nende sünteesimiseks. Peamine probleem on aminohappe lisamine asa-aminohappejäägi *N*-terminaalile.

Käesoleva töö eesmärk on sünteesida proteiinkinaas A minimaalse substraadi RRASVA asa-analoog RasaRASVA, kasutades tahke faasi peptiidsünteesi (SPPS) eeskirja. Töö tulemusena sünteesiti asa-peptiid RasaRASVA ning Ghosez reagent osutus seni testitud aminohappe aktivaatoritest efektiivseimaks asa-peptiidsideme moodustamisel Arg ja asaArg vahel. Samas asa-aminohappejäägi *N*-terminaalile järgmise aminohappe lisamise reaktsioonitingimused vajavad veel optimeerimist.

Märksõnad: asa-peptiid, asa-peptiidsüntees, asa-arginiin, Ghosez reagent, SPPS

Orgaaniline keemia – P390

Synthesis of aza-arginine containing aza-peptide H-RasaRASVA-NH₂

Peptides are important compounds for many fields, however their use as medicine is hindered by their low membrane permeability and low metabolic stability. To improve these shortcomings, peptidomimetics are developed. Aza-peptides are peptidomimetics which are primarily used to increase the metabolic stability of peptides in living organisms. The properties of aza-peptides have not been studied enough due to the lack of effective synthesis methods. Particularly, problematic is coupling of amino acids to the *N*-terminus of aza-amino acid residue.

The purpose of this bachelor's thesis is to synthesize RazaRASVA an aza-analogue of protein kinase A minimal substrate RRASVA using solid phase peptide synthesis (SPPS) method. As a result, aza-peptide RazaRASVA was synthesized. Ghosez reagent was found to be the most effective activator for aza-peptide bond formation between Arg and azaArg, although the reaction conditions for amino acid coupling to the *N*-terminus of the aza-amino acid residue need further optimization.

Keywords: aza-peptide, aza-peptide synthesis, aza-arginine, Ghosez reagent, SPPS

Organic chemistry – P390

Sisukord

INFOLEHT	2
Kasutatud lühendid	5
1. Sissejuhatus	7
2. Kirjanduse ülevaade.....	8
2.1 Peptiidid	8
2.1.1 Tahke faasi peptiidi süntees (SPPS).....	8
2.1.2 Peptiidide kasutusala	11
2.2 Peptidomimeetikud. Asa-peptiidid.....	11
2.2.1 Asa-peptiidide kasutusala ja probleemid.....	12
2.2.2 Asa-peptiidide süntees.....	12
3. Eksperimentaalne osa.....	19
3.1 Fmoc-Arg(Pbf)-OH sidumine Fmoc-asaArg-Phe-vaigule	19
3.2 Asa-arginiini prekursori süntees	20
3.2.1 Fmoc-hüdrasiini süntees	21
3.2.2 <i>N</i> -Boc-3-bromopropüülamiini süntees	21
3.2.3 <i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -(3- <i>N''</i> -Boc-propüül)hüdrasiini süntees.....	22
3.3 Asa-arginiini prekursori teine sünteesirada.....	23
3.3.1 <i>N,N'</i> -di-Boc- <i>S</i> -metüülsotiourea süntees	23
3.3.2 β -alaniini metüülestri vesinikkloriidi süntees.....	24
3.3.3 Metüül-3-(<i>N</i> ^{ω} , <i>N</i> ^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaadi süntees	24
3.3.4 <i>N</i> ^{ω} , <i>N</i> ^{ω} -di-Boc-3-guanidüülpropanaali süntees	25
3.3.5 <i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -(3- <i>N</i> ^{ω} , <i>N</i> ^{ω} -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini süntees	26
3.4 Peptiidjärjestuse Fmoc-ASVA-vaik süntees	27
3.5 Peptiidjärjestuse Fmoc-asaRASVA-vaik süntees	28
3.6 Peptiidjärjestuse Fmoc-RasaRASVA-vaik süntees.....	29

3.7 Fmoc-kaitserühma eemaldamine peptiidilt	30
3.8 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt	31
4. Tulemused ja arutelu	32
4.1 Fmoc-Arg(Pbf)-OH sidumine Fmoc-asaArg-Phe-vaigule	32
4.2 AsaArg prekursori süntees	32
4.2.1 AsaArg prekursori süntees läbi asa-ornitiini	33
4.2.2 AsaArg prekursori süntees läbi guanidüülpropanaali.....	33
4.3 H-RasaRASVA-NH ₂ süntees	35
Kokkuvõte.....	37
Summary	38
Kasutatud kirjandus	39
Lisad.....	41

Kasutatud lühendid

Lühend	Ingliskeelne nimetus	Eestikeelne nimetus
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitriil
AcOH	<i>Ethanoic acid</i>	Etaanhape
AH	<i>Amino acid</i>	Aminohape
Ala, A	<i>Alanine</i>	Alaniin
Arg, R	<i>Arginine</i>	Arginiin
asaAla, asaA	<i>Aza-alanine</i>	Asa-alaniin
asaArg, asaR	<i>Aza-arginine</i>	Asa-arginiin
Boc	<i>Tert-butoxycarbonyl</i>	<i>Tert</i> -butoksükarbonüül
BTC	<i>Bis(trichloromethyl) carbonate</i>	Bis(triklorometüül)karbonaat
Cbz	<i>Benzyloxycarbonyl</i>	Bensüüloksükarbonüül
COMU	<i>(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylaminomorpholino-carbenium hexafluorophosphate</i>	(1-tsüano-2-etoksü-2-oksoetülideenaminooksü)dimetüülaminomorpholiino-karbeenium heksafluorofosfaat
DCM	<i>Dichloromethane</i>	Diklorometaan
Ddz	<i>α,α-dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl</i>	α,α -dimetüül-3,5-dimetoksübensüüloksükarbonüül
DIBAL-H	<i>Diisobutylaluminium hydride</i>	Diisobütüülalumiiniumhüdriid
DIPEA	<i>N,N-diisopropylethylamine</i>	<i>N,N</i> -diisopropüülamiin
DMF	<i>N,N-dimethylformamide</i>	<i>N,N</i> -dimetüülformamiid
DMP	<i>Dess–Martin periodinane</i>	Dess-Martini perjodinaan

EA	<i>Ethyl acetate</i>	Etüülatsetaat
Fmoc	<i>Fluorenylmethoxycarbonyl</i>	Fluorenüülmetsükarbonüül
Ghosez reagent	<i>1-chloro-N,N,2-trimethyl-1-propenylamine</i>	1-kloro- <i>N,N,2</i> -trimetüül-1-propenüülamiin
HOBt	<i>Hydroxybenzotriazole</i>	Hüdoksübensotriasool
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanool
MS	<i>Mass spectrometer</i>	Massispektromeeter
NMP	<i>N-Methyl-2-pyrrolidone</i>	<i>N</i> -metüül-2-pürrolidoon
PE	<i>Petroleum ether</i>	Petrooleeter
PyBOP	<i>Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate,</i>	Bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidiinofosfoonium heksafluorofosfaat
PyOxim	<i>[Ethyl cyano(hydroxyimino)acetato-O²]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate</i>	[Etüül-tsüano(hüdoksüimiino)atsetaato- <i>O</i> ²] tri-1-pürrolidinüülfosfoonium heksafluorofosfaat
Ser, S	<i>Serine</i>	Seriin
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>	Tahke faasi peptiidisüntees
TBTU	<i>2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamminium tetrafluoroborate</i>	2-(1 <i>H</i> -bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülamiinium tetrafluoroboraat
TCFH	<i>Chloro-N,N,N',N'-tetramethylformamidinium hexafluorophosphate</i>	Kloro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüülformamidiiniumheksafluorofosfaat
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>	Tetrahüdofuraan
TMSCl	<i>Trimethylsilyl chloride</i>	Trimetüülsilüülkloriid

1. Sissejuhatus

Peptiidid on ravimitööstuses huvipakkuvad ühendid. Selleks, et suurendada nende metaboolset stabiilsust ja membraanläbitavust elusorganismides, luuakse erinevaid modifitseeritud peptiide. Ühed paljulubavad peptiidide analoogid ehk peptidomimeetikud on α -peptiidid. Need on modifitseeritud peptiidid, kus ühel või rohkematel aminohappejääkidel on α -süsinik asendatud α -lämmastikuga. [1]

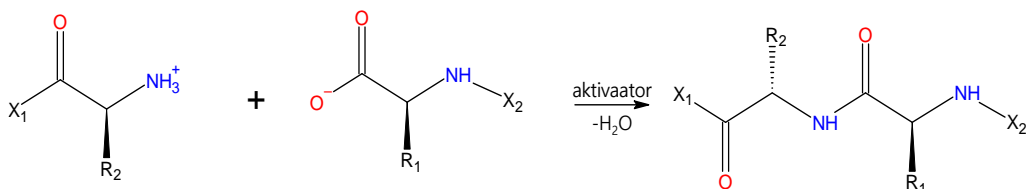
Peptiidiahelas aminohapete asendamine α -aminohapetega põhjustab peptiidis konformatsioonilisi muutusi. Need muutused võivad mõjutada peptiidi imendumist, transporti, seondumist ensüümide või retseptoritega ja metaboolset stabiilsust. Lisaks võivad α -peptiidid omada inimkehas paremaid interaktsioone proteiinide retseptoritega ning suuremat stabiilsust ensümaatilisele ja keemilisele degradatsioonile. Seetõttu uuritaksegi α -peptiidide erinevate bioloogiliste valdkondade ja ravimitööstuse tarbeks. Samas raskendavad α -peptiidide uuringuid nende madalad sünteesisaagised, mis tulevad eriti ilmsiks α -aminohappele järgmise aminohappe lisamisel. Madalamaid sünteesisaagiseid võivad põhjustada steeriliselt mahukate rühmad reaktsioonitsentri läheduses ning vale aktivaatori valik. [2-4]

Käesoleva töö eesmärk on sünteesida proteiinkinaas A minimaalse substraadi RRASVA α -analoog R α ASVA tahke faasi peptiidsünteesi meetodil (SPPS). Kuna α -aminohapete prekursorid pole kommertsiaalselt kättesaadavad, siis vajadusel sünteesitakse ka α Arg prekursor varasemalt väljatöötatud meetodikate alusel [5,6]. Eelnevalt on meie teadusgrupis sünteesitud teisi α -asendatud RRASVA molekule, kuid mitte antud töös sünteesitavat järjestust. Nagu eelpool öeldud, on α -peptiidi sünteesi kõige kriitilisem etapp α -aminohappele järgmise aminohappe sidumine, antud juhul α Arg-le järgneva Arg lisamine. Seega plaanitakse esialgu testida aktivaatorite 1-kloro-*N,N*,2-trimetüül-1-propenüülamiin (Ghosez reagent) ja (1-tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülidenaamiinooksü)dimetüül-aminomorfoliinokarbeeniüm heksafluoro fosfaadi (COMU) efektiivsust Arg ja α Arg vahelise α -peptiidsideme moodustamisel mudelpeptiidis H-Arg- α Arg-Phe-NH₂. Ghosez reagent on varasemates uuringutes osutunud üheks efektiivsemaks aktivaatoriks Tyr sidumise α Val *N*-terminaalile [7] ja COMU on olnud efektiivseim aktivaator Ala sidumisel α Ala-le [2]. Arg ja α Arg vahelise α -peptiidsideme teket nende aktivaatoritega ei ole veel testitud. Eelkatse põhjal valitakse efektiivseim aktivaator α -peptiidsideme moodustamiseks. Töö tulemused aitavad kaasa α -peptiidide sünteesimeetodikate arendamisele.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Peptiidid

Peptiidid on aminohappejääkidest koosnevad ühendid, kus aminohappejäägid on omavahel ühendatud amiidsidemete ehk peptiidsidemetega. Peptiidside moodustub ühe aminohappe α -karboksüülrühma ja teise aminohappe α -aminorühma vahel. Aminorühma ja karboksüülrühma vahelise kondensatsioonireaktsiooni tulemusena eraldub vesi ning moodustub peptiid (Skeem 1) [8].

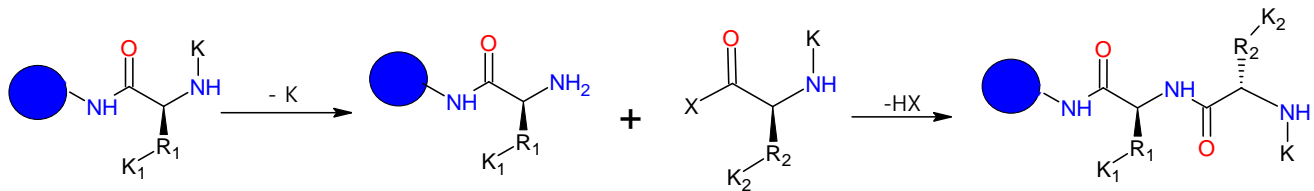


Skeem 1. Peptiidi moodustumise üldine skeem [8]. R_1 ja R_2 on aminohappejääkide külgrühmad ning X_1 ja X_2 on aminohappejäägid.

Enamik peptiide on lineaarsed, kuid eksisteerib ka tsüklilisi peptiide. Üldiselt vaadeldakse vaid 20 standardaminohapet, mida kodeerib elusorganismides DNA, kuid kokku eksisteerib looduses üle 700 aminohapet. Kõik DNA kodeeritavad aminohapped (v.a proliin) sisaldavad primaarset aminorühma α -süsiniku küljes. Inimestele on kodeeritavatest aminohapetest üheksa asendamatud - neid peab omandama toidust. Kuus aminohapet on tinglikult asendamatud ehk asendamatud mõnede haiguste korral ja viis aminohapet on asendatavad ehk inimorganism suudab neid sünteesida. [8]

2.1.1 Tahke faasi peptiidi süntees (SPPS)

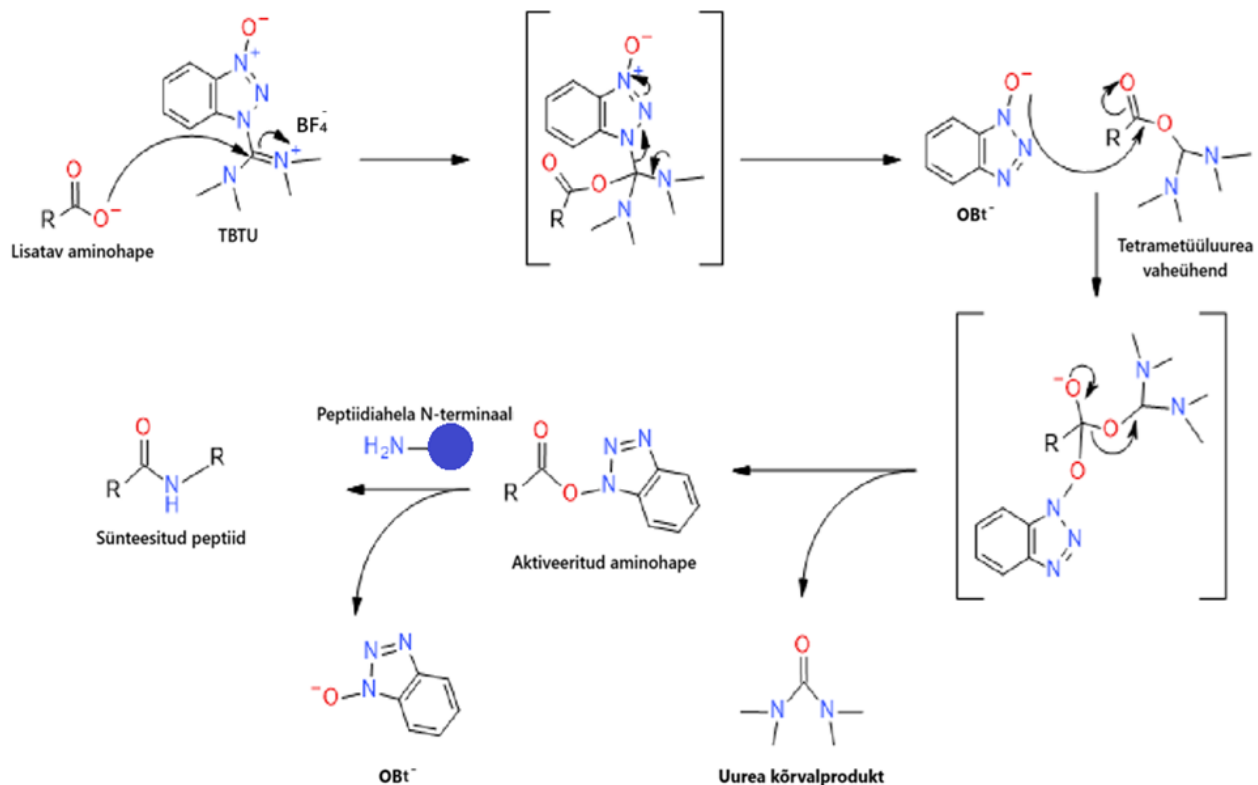
Lisaks looduslikele peptiididele on neid võimalik ka sünteesida. Esimesed sünteetilised peptiidid loodi juba aastal 1901 Fisheri ja Fournau poolt [9]. Algselt sünteesiti peptiide lahuses, kuid vedelfaasi peptiidsünteesi meetodi (LPPS) puudused on aeganõudvad ja keerulised puhastusetapid peale iga aminohappe lisamist [10]. 20. sajandi teisel poolel lõi Merrifield tahke faasi peptiidi sünteesi (SPPS) protokoll (Skeem 2) [11].



Skeem 2. Tahke faasi peptiidisünteesi skeem [10]. R₁ ja R₂ on molekulide külghelad, K on ajutine kaitserühm, K₁ ja K₂ on külghelate püsivad kaitserühmad, ● - on tahke kandja ja X on aktivaatorist tulenev lahkuv rühm.

SPPS meetod näeb ette, et esimene aminohape peptiidiahelas seotakse kovalentselt polümeeri funktsionaalse rühma (*linkeri*) abil polümeeri ehk tahke kandja (vaigu) külge, mis ei lahustu peptiidisünteesis kasutatavates lahustites. Samas peab tahke kandja lahustites hästi punduma, et difusioon polümeeri maatriksisse oleks kiirem. Lisaks peab tahke kandja olema füüsiliselt piisavalt vastupidav, et see ei laguneks filtreerimise käigus. Peamiselt kasutatakse SPPS-is ristsidestatud polüstüreenil põhinevaid tahkeid kandjaid, aga ka polüetüleenglükoolil, polüamiidil jt polümeeridel baseeruvaid vaike. SPPS meetodi abil saab sünteesida peptiide palju kiiremini ja robustsemalt, kuna seal on tülikad puhastusetapid asendatud kiiremate pesuetappidega. [10,11]

Peptiidisünteesis on olulisel kohal kaitserühmade ning aminohappe aktivaatorite kasutamine. Kaitserühmade kasutamise eesmärk on ära hoida soovimatuid kõrvalreaktsioone ja polümeriseerumist. Lisataval aminohappel on kaitstud α-aminorühm. Peptiidiahelal, kuhu aminohapet lisatakse, on kaitstud C-terminaali karboksüülrühm ja vajadusel külghelad. Aminorühma kaitserühm on ajutine ehk selektiivselt ning lihtsalt eemaldatav, et saaks jätkata peptiidisünteesi. Karboksüülrühma ning külghelate kaitserühmad on püsivad. Tihti on peptiidiahela C-terminaali kaitserühmaks *linkeri* abil seotud ristsidestatud polüstüreen või erinevad estrid. N-terminaali kaitserühmad põhinevad sageli uretaanil, näiteks fluorenüülmetskükarbonüül (Fmoc), *tert*-butoksükarbonüül (Boc) ja bensüüloksükarbonüül (Cbz) kaitserühmad. Peptiidi külghelate kaitserühmade kasutamine sõltub peptiidi aminohappelisest koostisest, kuid peamiselt kasutatakse Boc ja bensüül (Bn) kaitserühmasid [10]. Aktivaatorite kasutamise eesmärk on aktiveerida peptiidijärjestusse lisatava aminohappe karboksüülrühm, et moodustuks peptiidside (Skeem 3).



Skeem 3. Peptiidideme moodustumise reaktsioonimehhanismi näide aktivaatoriga TBTU [13]. R on aminohappe α -süsinik, TBTU ja OBt^- on aktivaatorid ning ● on tahke kandja.

SPPS-is on kasutusel lai valik aktivaatoreid. Levinumad aktivaatorite klassid SPPS-is on karbodiimidid (nt N,N' -diisopropüülkarbodiimid (DIC)), oksüma derivaatide fosfooniumsoolad (nt [etüül-tsüano(hüdroksüimiino)atsetaato- O^2] tri-1-pürrolidinüülfosfoonium heksafluorofosfaat (PyOxim) ja COMU) ja tetrametüülamiinium soolad (nt 2-(1*H*-bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülamiinium tetrafluoroboraat (TBTU)) [7,11]. Karbodiimidide, oksüma derivaatide ja tetrametüülamiinium soolade kasutamise korral lisatakse ka bensotriasool (nt hüdroksübensotriasool (HOBt)) kõrvalreaktsioonide ja ratsemisatsiooni vähendamiseks. Oksüma derivaatide fosfooniumsoolade ja tetrametüülamiinium soolade kasutamise korral lisatakse ka alust (nt N,N -diisopropüülamiin (DIPEA)), et deprotoneerida aktiveeritava aminohappe karboksüülrühm. Karbodiimidid sisaldavad kahte aluselist lämmastiku, seega pole nende kasutamise puhul aluse lisamine vajalik. [14,15]

2.1.2 Peptiidide kasutusala

Peptiidid on mitmetes eri valdkondades palju huvi pakkuvad molekulid. Toiduainetööstuses kasutatakse aspargiinhappe ja fenüülalaniini dipeptiidi metüülestrit ehk aspartaami suhkruasendajana [16]. Kosmeetikatööstuses kasutatakse samuti erinevaid bioaktiivseid peptiide, nagu kollageen, tsütokiinid, türosinaas jm, naha omaduste parandamiseks [17]. Ravimitööstuses on peptiidid samuti olulisel kohal, lisaks vasopressinile ja oksütotsiinile on tähtsaim peptiidravim 20. sajandi algul eraldatud 51 aminohappejärgist koosnev diabeetikutele mõeldud hormoon, insuliin [18]. Aastaks 2027 prognoositakse, et peptiidravimite turg ületab 50 miljardi dollari piiri [19]. Peptiidravimite suurim eelis on kõrge selektiivsus ja afiinsus retseptoritega seostumisel, seega on peptiidravimid minimaalsete kõrvaltoimetega. [18]

2.2 Peptidomimeetikud. Asa-peptiidid

Peptiidide kasutamist ravimitena raskendavad kaks peamist faktorit: peptiidide halb membraanläbitavus ning väike metaboolne stabiilsus elusorganismides. Peptiidide membraanläbitavuse suurendamiseks ning stabiilsuse tõstmiseks elusorganismides sünteesitakse erinevaid peptidomimeetikuid. Peptiidiahela selgroogu modifitseerides üritatakse saavutada vastupidavust ensümaatilisele degradatsioonile. Seda tehakse asendades peptiidiahelas L-aminohappeid D-aminohapetega või tava-aminohappeid N-metüülaminohapete või β -aminohapetega ja veel paljudel teistel viisidel. Muutes aminohappe külghela struktuuri suurendatakse retseptoritega seostumise afiinsust ning selektiivsust. [18]

Üks paljulubav peptidomimeetikute klass on asa-peptiidid, kus peptiidiahelas on vähemalt üks tava-aminohape vahetatud asa-aminohappe vastu (Skeem 4) [20].



Skeem 4. Tava-aminohappe (a) ja asa-aminohappe (b) struktuuri võrdlus [21]. R on aminohappe kõrvalahel.

Asa-aminohapete N_{α} -C(O) side on jäigem kui tava-aminohapete C_{α} -C(O) side. See vähendab asa-peptiidi painduvust ning muudab asa-peptiidi keemilisi ja biokeemilisi omadusi võrreldes tava-peptiidiga. Asa-aminohapetel ei ole kiraalset tsentrit, α -lämmastiku vaba elektronpaar muudab asa-

aminohappe planaarseks ning asa-aminohappejäägi aminorühmaga tekkiva peptiidsideme samuti planaarsemaks. Lisaks põhjustab vaba elektronpaar α -lämmastikul resonantsi, mis suurendab α -lämmastikuga seotud aminorühma happelisust ning tänu sellele annab asa-peptiid tugevamaid vesiniksidemeid ja ei protoneeru füsioloogilisel pH-l. [7,21-23]

2.2.1 Asa-peptiidide kasutusala ja probleemid

Asa-peptiidide parema vastupidavuse tõttu ensümaatilisele degradatsioonile võrreldes tava-peptiididega, on need huvipakkuvad ühendid ravimiarenduses [24]. Asa-peptiide on kasutatud seriini ja tsüsteiini proteaasi inhibiitoritena, A-hepatiit viiruse 3C proteaasi inhibiitorina, C-hepatiit viiruse NS3 seriini proteaasi inhibiitorina ja inimestel neutrofiilse proteaasi inhibiitorina [25]. Lisaks eelnevale on Ameerika Ühendriikide toidu- ja raviameti (FDA) poolt heakskiidu saanud asa-peptiidravimid Atazanavir (Reyataz®) ja Goserelin (Zoladex®) mida kasutatakse vastavalt HIV raviks ja vähiraviks [26,27].

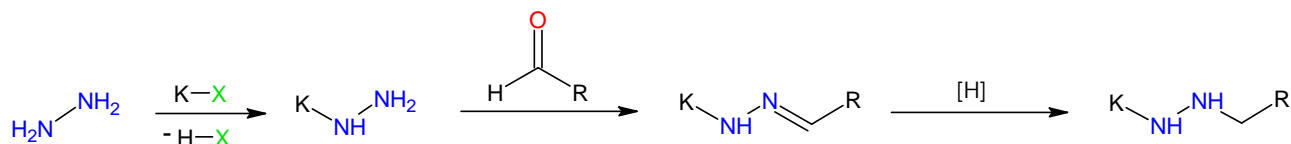
Asa-peptiidide omaduste uurimist aga takistavad mitmed faktorid. Asa-aminohapped on ebastabiilsed ning seetõttu tuleb kasutada vastavaid hüdrasiini derivaate asa-peptiidide sünteesiks. Nimetatud hüdrasiini derivaadid ei ole kommertsiaalselt kättesaadavad, seega nõuab asa-peptiidi süntees eelnevat asa-aminohappe prekursori sünteesi. Kuna asa-aminohappe lisamisel peptiidiahelasse kasutatakse asa-aminohappe prekursorit, tuleb selle atsüülimiseks kasutada tugevaid atsüülivaid reagente (nt fosgeen), mis on tihti mürgised. Asa-aminohappejäägile järgmise aminohappe lisamine on samuti raskendatud, kuna α -süsiniku asendamine α -lämmastikuga indutseerib resonantsi asa-aminohappejäägis, mis omakorda vähendab aminorühma nukleofiilsust. Vähenenud nukleofiilsuse tõttu on asa-peptiidsideme moodustumine otsesel SPPS meetodi rakendamisel aeglane ja ebaefektiivne, mistõttu on vaja muuta lisatava aminohappe karboksüülrühm reaktsioonivõimelisemaks kasutades efektiivsemaid aktivaatoreid või arendada teisi sünteesimeetodeid. [21]

2.2.2 Asa-peptiidide süntees

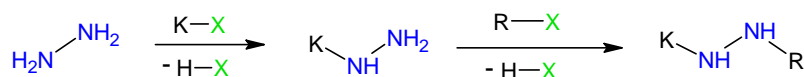
2.2.2.1 Asa-aminohapete prekursorite sünteesirajad

Asa-aminohapete prekursorid sünteesitakse lähtudes kaitserühmaga monokaitstud hüdrasiini derivaatidest. Asa-aminohapete prekursorite sünteesiks kasutatakse peamiselt kolme meetodit:

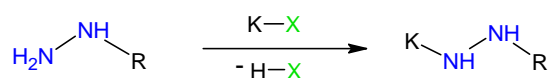
- 1) hüdrasiini redutseerivat amiinimist (Skeem 5) [21];
- 2) hüdrasiini ja selle derivaatide otsest alküülimist (Skeem 6) [21];
- 3) alküülitud hüdrasiini kaitsmist kaitserühmaga (Skeem 7) [28].



Skeem 5. Asa-aminohappe prekursori süntees hüdrasiini redutseerival amiinimisel [21]. K on ajutine kaitserühm, X on Cl, Br või I, R on alküülalabel ning [H] sümboliseerib redutseerimist.



Skeem 6. Asa-aminohappe prekursori süntees kaitserühmaga hüdrasiini alküülimisel [21]. K on ajutine kaitserühm, R on alküülalabel ning X on Cl, Br või I.



Skeem 7. Asa-aminohappe prekursori süntees alküülitud hüdrasiini kaitsmisel kaitserühmaga [28]. K on ajutine kaitserühm, R on alküülalabel ning X on Cl, Br või I.

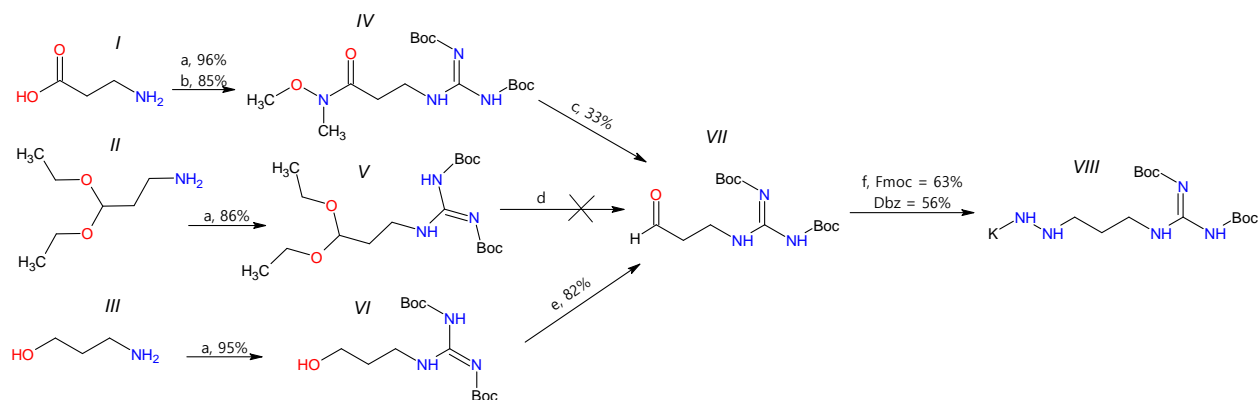
1. ja 2. meetodi korral alustatakse sünteesi monokaitstud hüdrasiini sünteesist [21]. Hüdrasiini redutseeriv amiinimine (Skeem 5) on kolmeetapiline sünteesimeetod, mille käigus tekib hüdrasoonne vaheühend, mida redutseeritakse enamasti nõrga happe juuresolekul NaBH_3CN -ga kiirelt ja selektiivselt [21,29]. Otsene alküülimine (Skeem 6) on mugav sünteesimeetod, mis koosneb vaid kahest etapist, kuid alküülimisreaktsiooni käigus võib mono-alküülitud hüdrasiin edasi alküüluda ka di- ja tri-alküülitud hüdrasiinideks, vähendades reaktsiooni saagist. Kõrvalreaktsioone saab suures osas ära hoida, kui kasutada monokaitstud hüdrasiini vähemalt kolmekordses ülehulgas. [21,30]

Alküülitud hüdrasiini kaitsmine kaitserühmaga (Skeem 7) on kõige lihtsam ja kiirem meetod, kuid selle abil saab sünteesida vaid väikest hulka asa-aminohapete prekursoreid vajalike alküülhüdrasiini derivaatide kommertsiaalse puuduse tõttu. Lisaks pole 3. meetod spetsiifiline primaarse aminorühma suhtes ning kaitserühm võib kinnituda ka sekundaarsele aminorühmale, mis vähendab saagist ning raskendab soovitud asa-aminohappe prekursori eraldamist. [21,30]

Asa-peptiidide uurimist raskendavad lisaks asa-aminohapete prekursorite sünteesivajadusele ka osade asa-aminohapete prekursorite (asaSer, asaThr, asaHis ja asaCys) sünteesimetoodikate puudumine [21].

AsaArg prekursorite sünteesiradu on kirjeldanud Freeman *et al.* [31] ning Mastitski *et al.* [5,6].

Freeman *et al.* artiklis prooviti sünteesida asa-arginiini prekursorit järgides kolme erinevat sünteesirada, millest kaks õnnestus lõpule viia (Skeem 8). Kõikide sünteesiradade esimeseks reaktsiooniks on vastava lähteaine aminorühma guanidileerimine. Sõltuvalt lähteainest järgneb Weinrebi amiidi redutseerimine LiAlH_4 -ga, alkoholi oksüdeerimine Dess-Martini perjodinaaniga (DMP) või atsetaali hüdrolyüs aädikhappe lahuses aldehüüdiks (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaal **VII**. Viimase sammuna viiakse läbi redutseeriv amiinimine (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaali **VII** ja monokaitstud hüdrasiini vahel, segades need kokku ning hiljem redutseerides tekkinud hüdrasooni NaBH_3CN -ga, andes asaArg prekursori **VIII**. [31]

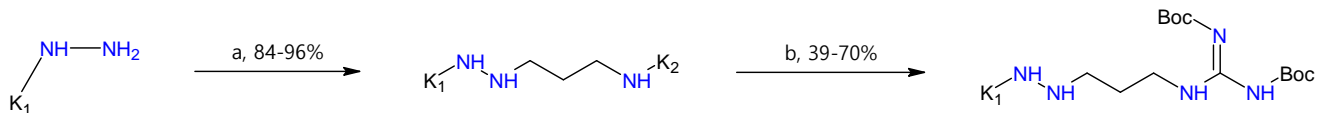


Skeem 8. Freeman *et al* kirjeldatud asaArg sünteesi sünteesirajad [31]. Boc on Boc-kaitserühm ja K on Fmoc- või α, α -dimetüül-3,5-dimetoksübensüüloksükarbonüül- (Ddz) kaitserühm. Kasutatud reagentid: a) N, N' -di-Boc-metüülisotiourea, 4-dimetüülaminopüridiin (DMAP); b) N, O -dimetüülhüdroksüülamiin vesinikkloriid, bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidiino-fosfoonium heksafluorofosfaat (PyBOP), DIPEA; c) LiAlH_4 ; d) etaanhape (AcOH) / H_2O ; e) DMP; f) 1) K-NH-NH_2 , seejärel 2) NaBH_3CN , AcOH

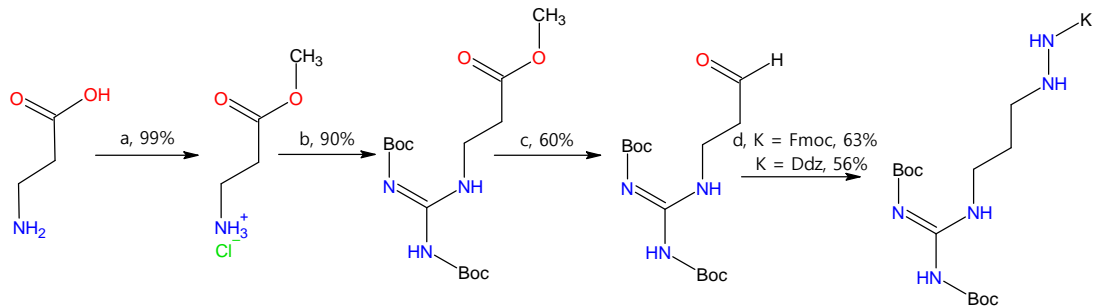
Freeman *et al.* väljapakutud sünteesiradade (Skeem 8) läbiviimisel esines mitmeid probleeme. Esiteks andis (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaanhappe Weinrebi amiidi **IV** redutseerimine aldehüüdiks (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaal **VII** LiAlH_4 -ga madalaid saagiseid ning reaktsioonisegu puhastamine oli keeruline. Teiseks ei suudetud (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaanhappe atsetaali **V** hüdrolyüsil aldehüüdi (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaal **VII** sünteesida. Kolmandaks alkoholist (N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanool **VI** DMP abil

tekkunud aldehüüdi (N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaal **VII** pesu NaHCO_3 -ga ja $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ga põhjustas molekulisest tsükliseerumist ja ühe Boc-kaitserühma eemaldumist. Samas, kui viia alkoholi (N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanool **VI** oksüdeerumisreaktsioon aldehüüdiks (N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)-propanaal **VII** läbi kasutades lahustina püridiini ning hiljem pesta reaktsioonisegu lahja NaOH lahusega, siis hoiti Boc-kaitserühma eemaldumine ära ja saadi kõrge saagisega produkt. Lisaks on järgnev redutseeriva amiinimise reaktsioon kõrge selektiivsusega. [31]

Mastitski *et al.* artiklites on kirjeldatud kahte sünteesirada, millest esimene põhineb asa-ornitiini prekursori [5] ja teine N^{ω},N^{ω} -di-Boc-3-guanidüülpropanaali sünteesil [6]. Esimese meetodi (Skeem 9) kohaselt alküülitakse monokaitstud Fmoc-hüdrasiini N -metüül-2-pürrolidoonis (NMP) N -Boc-3-bromopropüülamiiniga, et saada kaitserühmadega kaitstud asa-ornitiini prekursor. Seejärel konverteeritakse asa-ornitiini prekursor asa-arginiini prekursoriks, eemaldades asa-ornitiini prekursorilt trifluoroäädikhappe (TFA) abil Boc-kaitserühma ning guanidileerides külghela aminorühma N,N' -di-Boc- N'' -trifüülguanidiiniga aluselises keskkonnas [5]. Teise meetodi (Skeem 10) kohaselt sünteesitakse kõigepealt β -alaniini metüülester β -alaniini ja metanooli vahelisel kondensatsioonireaktsioonil. Järgmiseks sünteesitakse metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaat, guanidileerides β -alaniini metüülestrit aluselises keskkonnas N',N' -di-Boc- S -metüül-isotiouureaga. Seejärel redutseeritakse metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaadi metüülester vedela lämmastiku abil jahutatud keskkonnas diisobutüülalumiiniumhüdriidiga (DIBAL-H) aldehüüdiks. Viimase sammuna viiakse läbi redutseeriv amiinimine: (N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaali ja Fmoc-hüdrasiini vahel tekkivat hüdrasooni redutseeritakse selektiivselt NaBH_3CN -ga, andes Fmoc-kaitstud asaArg prekursori [6].



Skeem 9. Mastitski *et al.* kirjeldatud asaArg prekursori sünteesirada läbi asa-ornitiini prekursori [5]. K_1 on Fmoc-, Boc-, või Cbz-kaitserühm, K_2 on Boc-, Cbz-, allüüloksükarbonüül (Aloc)- või Fmoc-kaitserühm. Kasutatud reagentid: a) N -kaitstud 3-bromopropüülamiin; b) 1) TFA/diklorometaan (DCM) 2) N,N' -di-Boc- N'' -trifüülguanidiin ja trietüülamiin (TEA).



Skeem 10. Mastiski *et al.* kirjeldatud asaArg prekursori sünteesirada läbi N^{ω},N^{ω} -di-Boc-3-guanidüülpropanaali [6], viimane redutseeriva amiinimise etapp Freeman *et al.* kirjeldatud [31]. K on Fmoc- või Ddz-kaitserühm. Kasutatud reagentid: a) trimetüülsilüülkloriid (TMSCl) ja MeOH b) N,N' -di-Boc-*S*-metüülisotiourea, DIPEA ja N,N -dimetüülformamiid (DMF) c) DIBAL-H d) 1) K-NH-NH₂, seejärel 2) NaBH₃CN, AcOH.

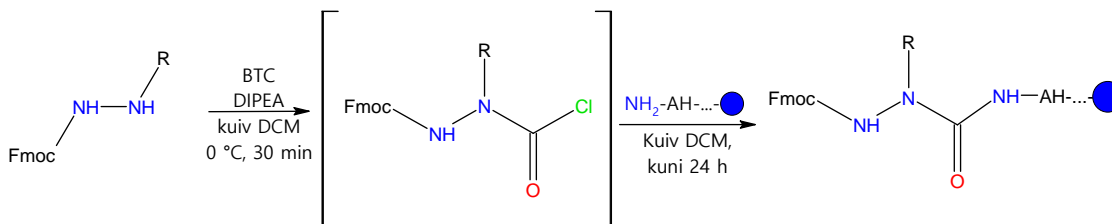
Esimese Mastitski *et al.* väljakäidud sünteesiraja (Skeem 9) eelised võrreldes teistega on, et see sünteesirada lühem, olenevalt reaktsioonist on sünteesi saagised head kuni kvantitatiivsed ning kasutatavad reagentid on kättesaadavad või pole nende valmistamine keeruline. Samas nõuab monokaitstud Fmoc-hüdrasiini alküülimine N -Boc-3-bromopropüülamiiniga suurt Fmoc-hüdrasiini ülehulka, veevaba solventi ning täpset temperatuurikontrolli, sest reaktsioon ei toimu madalatel temperatuuridel ning Fmoc-kaitserühm eemaldub kõrgematel temperatuuridel. [5,31]

Teise Mastitski *et al.* väljakäidud sünteesiraja (Skeem 10) eelis on sarnaselt Freeman *et al.* väljapakutud sünteesiradadega redutseeriva amiinimise reaktsiooni selektiivsus. Samas nõuab metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaadi redutseerimine DIBAL-H-ga madalat temperatuuri ning täpset temperatuurikontrolli. Lisaks sõltub reaktsiooni saagis tugevalt reaktsiooni käigus tekkivate alumiiniumatsetaalide stabiilsusest, mis piirab kasutatavate solventide valikut. [6]

2.2.2.2 Asa-aminohapete sidumine peptiidiahelasse

Asa-aminohapete prekursorite sidumiseks peptiidiahelasse on mitmeid mooduseid: näiteks võib aktiveerida lisatava asa-aminohappe prekursori või peptiidi N -terminaali, kuhu asa-aminohappe prekursorit lisatakse fosgeeni või fosgeeni derivaadi bis(triklorometüül)karbonaadiga (BTC) või võib aktiveerida lisatava asa-aminohappe bensaldehüüdi hüdrasooni para-nitrofenüül-oksükarbonüüluga. [23,32]. Lisaks on asaGly sidumiseks peptiidiahelasse kasutatud aktivaatorit N,N' -disuktsiinimidüülkarbonaat (DSC) [7].

Enamasti kasutatakse meetodit, kus lisatav asa-aminohappe prekursor muudetakse fosgeeni või BTC abil reaktsioonivõimeliseks klooranhüdriidiks, mis reaktsioonil peptiidi *N*-terminaaliga annab peptiidsideme (Skeem 11). Kõrvalreaktsioonide vähendamiseks toimub aktiveerimine tavaliselt inertse gaasi keskkonnas kuivas lahustis ja madalal temperatuuril [23,32].

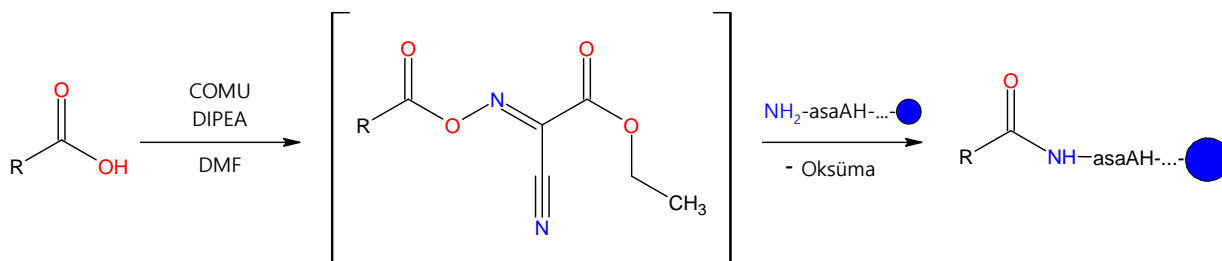


Skeem 11. Lisatava aminohappe *C*-terminaali aktiveerimine aktivaatoriga BTC [33]. Fmoc on Fmoc-kaitserühm, R on asa-aminohappe külghel, AH on aminohappejääk mille aminorühmale lisatakse asa-aminohappe prekursorit, ● on tahke kandja.

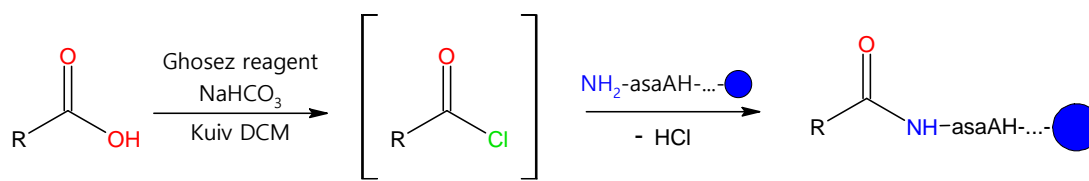
2.2.2.3 Asa-peptiidsideme süntees

Asa-peptiidsideme moodustumine on tunduvalt aeglasem võrreldes tava-peptiidsideme moodustumisega asa-aminohappejäägi madalama nukleofiilsuse tõttu. Lisaks sõltub asa-peptiidsideme moodustumise kiirus ja reaktsioonisaagis oluliselt aktivaatori valikust. Varasemalt on meie teadusgrupis katsetatud oksümal põhinevad aktivaatoreid COMU ja PyOxim ning bensotriasoolil põhinevaid aktivaatoreid 1-[bis(dimetüülamino)metüleen]-1H-1,2,3-triasolo[4,5-b]püridiinium-3-oksiid heksafluorofosfaat (HATU), TBTU, PyBOP, 2-(6-kloro-1-H-bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülamiinium heksafluorofosfaat (HCTU) ja 6-kloro-1-((dimetüülamino)(morfolino)-metüleen)-1H-bensotriasoolium heksafluorofosfaat-3-oksiid (HDMC) asa-peptiidsideme sünteesiks mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH₂. Neist efektiivseimad olid COMU (Skeem 12) ja PyOxim, kuid reaktsioon oli võrreldes tava-peptiidsideme moodustumisega ligikaudu 30 korda aeglasem. Lisaks täheldati, et reaktsiooni kiirus ei sõltu vaid aktivaatori valikust, vaid ka steeriliselt mahukate rühmade olemasolust reaktsioonitsentri läheduses [4]. Kusjuures asa-aminohappe külghela mahukus mõjutab selle *N*-terminaalile liidetava aminohappe sidumise efektiivsust enam kui lisatava aminohappe enda ruumiline mahukus. Näiteks on meie teadusgrupis testitud asa-peptiidi mudelühendis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ Ala sidumist aktivaatoriga COMU asaVal-i *N*-terminaalile, mis sisaldab steeriliselt kõige mahukamat külgrühma ning see reaktsioon praktiliselt ei toimunud [4]. Ka ei sobi aktivaator COMU Tyr sidumiseks asaVal-i *N*-terminaalile [7]. Tyr sidumiseks asaVal-le testis

sama uurimisgrupp veel teisigi aktivaatoreid nagu BTC, PyBOP, kloro-*N,N,N',N'*-tetrametüülformamiidinium-heksafluorofosfaat (TCFH) ja Ghosez reagent. Parima saagise neist andis reaktsioon aktivaatoriga TCFH, kuid selle kasutamisel täheldati võimalikku epimerisatsiooni *asa*-peptiidside moodustumisel. Efektiivselt järgmine aktivaator oli aga Ghosez reagent (Skeem 13), millega epimerisatsiooni ei täheldatud. Seda reagenti ei ole teiste *asa*-peptiidide järjestuste peal veel testitud. [2]



Skeem 12. *Asa*-peptiidi süntees aktivaatoriga COMU [35]. R on lisatava aminohappe α -süsinik, *asaAH* on *asa*-aminohappejääk, millele aminohapet lisatakse ja \bullet on tahke kandja.



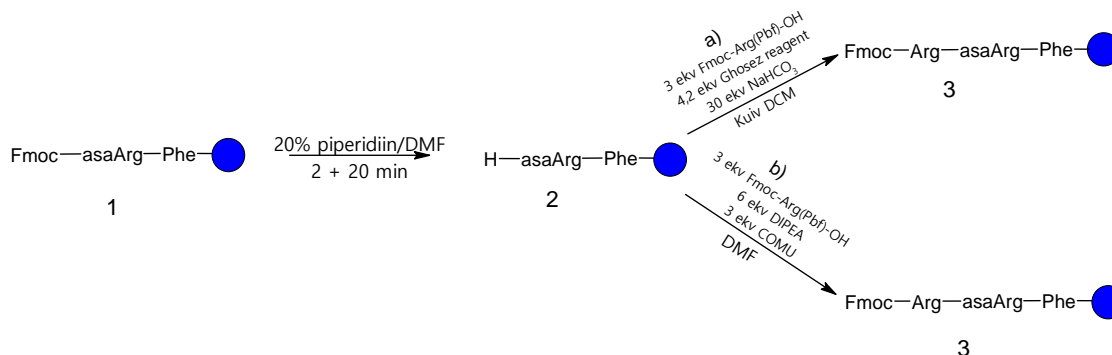
Skeem 13. *Asa*-peptiidi süntees aktivaatoriga Ghosez reagent [36,37]. R on lisatava aminohappe α -süsinik, *asaAH* on *asa*-aminohappejääk, millele aminohapet lisatakse ja \bullet on tahke kandja.

3. Eksperimentaalne osa

Töös kasutatud reagentid ja töövahendid on leitavad lisast 1.

3.1 Fmoc-Arg(Pbf)-OH sidumine Fmoc-asaArg-Phe-vaigule

Fmoc-Arg(Pbf)-OH sidumine Fmoc-asaArg-Phe-vaigule Ghosez reagenti ja COMU-ga toimus väikeste muudatustega Ref [7] toodud eeskirja järgi.



Skeem 14. Arg ja asaArg vahelise asa-peptiidi süntees aktivaatoritega COMU ja Ghosez reagent. Fmoc on Fmoc-kaitserühm ja ● on tahke kandja.

Tripeptiidi moodustamiseks kaaluti kahte filtriga süstlasse Fmoc-asaArg-Phe-vaik (1) (1 ekv ; 20 mg; 13,6 μmol). Süstaldesse lisati DCM (2 ml) ning vaigul lasti loksutil punduda 20 min. Seejärel eemaldati Fmoc-kaitserühm eemaldati alapeatüki 3.7 järgi. Ühte filtriga süstlasse lisati kaitsmata dipeptiidile (2) COMU-ga aktiveeritud Fmoc-Arg(Pbf)-OH, teise Ghosez reagentiga aktiveeritud Fmoc-Arg(Pbf)-OH.

Süstlasse, kuhu plaaniti lisada Ghosez reagentiga aktiveeritud Fmoc-Arg(Pbf)-OH, lisati NaHCO₃ (30 ekv; 34,3 mg; 408 μmol) ja kuiv DCM (2 ml) ning segul lasti loksuda 10 min. Samal ajal lahustati kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolvis Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 ekv; 27 mg; 40,8 μmol) kuivas DCM-is (0,2 ml) ning lahus jahutati jäävannil 0 °C-ni. Intensiivse segamisega lisati Fmoc-Arg(Pbf)-OH lahusele tilkhaaval Ghosez reagent (4,2 ekv; 8 μl; 57,1 μmol) ning lahus segati 5 min 0 °C juures. Seejärel lasti lahusel soojeneda toatemperatuurini ja aktiveeritud Fmoc-Arg(Pbf)-OH kanti pipeti abil filtriga süstlasse ning reaktsioonil lasti loksutil käia 2 h (Skeem 14a). Peale reaktsiooni peatamist pesti vaiku DMF (2 × 5 ml) ja DCM-ga (1 × 5 ml), misjärel võeti analüüsiks proovikogus (~ 2 mg) vaiku uude filtriga süstlasse. Seejärel lisati vaigule uued kogused lähteaineid peale (v.a NaHCO₃, mis juba oli süstlas) ja reaktsioonil lasti loksutil käia veel

14 h. Peale reaktsiooni peatamist võeti reaktsioonisegust taas proovikogus (~ 2 mg) vaiku uude filtriga süstlasse. Proovidega süstlad pesti DMF-ga (2 × 2 ml), MeOH (2 × 2 ml), Milli-Q veega (2 × 2 ml), DMF-ga (2 × 2 ml) ja DCM-ga (2 × 2 ml).

Asa-peptiidside sünteesi läbiviimiseks aktivaatoriga COMU kaaluti katsutitesse COMU (3 ekv; 18 mg; 40,8 µmol) ja Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 ekv; 27 mg, 40,8 µmol). COMU lahustati DMF-is (1 ml) ning seejärel lisati COMU lahusele DIPEA (6 ekv; 14 µl; 80,6 µmol). Fmoc-Arg(Pbf)-OH lahustati samuti DMF-is (1 ml) ning kõik reagentid kanti süstlas olevale H-asaArg-Phe-vaigule. Reaktsioonil lasti loksutil käia 2 h (Skeem 14b). Seejärel pesti vaiku DMF-ga (3 × 2 ml), DCM-ga (3 × 2 ml), DMF-ga (3 × 2 ml) ja DCM (1 × 2 ml). Reaktsioonisegust võeti proovikogus (~ 2 mg) vaiku uude filtriga süstlasse. Algele filtriga süstlale pandi uued kogused lähteaineid peale ning reaktsioonil lasti loksutil veel käia 14 h. Reaktsioonisegust võeti taas proovikogus (~ 2 mg) vaiku uude filtriga süstlasse. Proovidega süstlaid pesti DMF (3 × 2 ml), DCM (3 × 2 ml), DMF (3 × 2 ml) ja DCM (1 × 2 ml).

Peptiidjärjestuse Fmoc-Arg-asaArg-Phe-vaik (**3**) sünteesi edukust kontrolliti kõrgefektiivse vedelikkromatograafia-massispektromeetria (HPLC-MS) abil. Reageerimata lähteaine (H-asaArg-Phe-vaik (**2**)) hulga hindamiseks kinnitati Fmoc-kaitserühm tagasi lähteainele tuginedes varasemalt väljatöötatud meetodikale [4]. Selleks kaaluti katsutisse Fmoc-Cl (7 mg/10 mg vaigu kohta) ning see lahustati DCM-is (4 ml). Igasse süstlasse lisati K₂CO₃ (u 1 mg) ning Fmoc-Cl lahus DCM-is (1 ml). Reaktsioonil lasti loksutil käia 1 h. Peale reaktsiooni pesti kõikides süstaldes vaiku DMF-ga (3 × 2 ml), Milli-Q veega (2 × 2 ml), DMF-ga (1 × 2 ml) ja DCM-ga (3 × 2 ml).

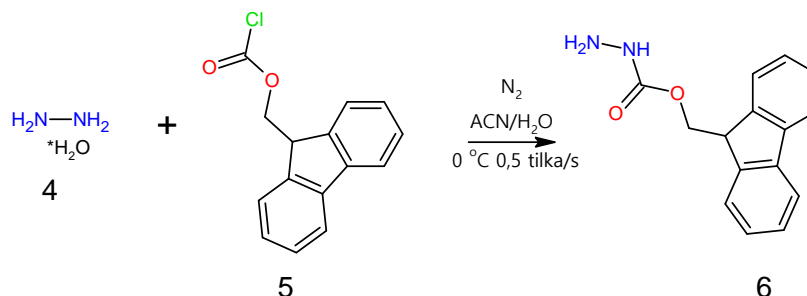
Proovide analüüsi järgmiseks sammuks eemaldati peptiidid tahkelt kandjalt koos püsivate kaitserühmadega alapeatüki 3.8 kohaselt.

Sünteesitud tripeptiididele vastavad HPLC-MS kromatogrammid ja massispektrid on lisades 2-5.

3.2 Asa-arginiini prekursori süntees

Asa-arginiini prekursori sünteesi viidi läbi väikeste muudatustega Ref.[5] toodud eeskirja järgi

3.2.1. Fmoc-hüdrasiini süntees

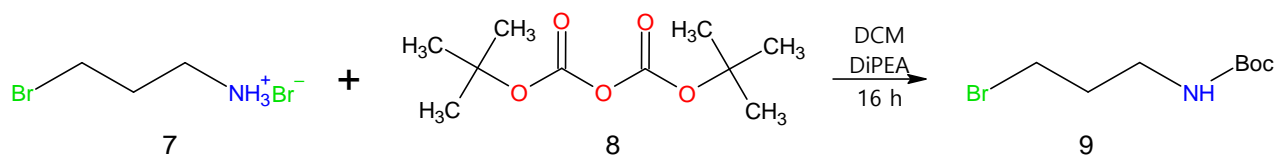


Skeem 15. Fmoc-hüdrasiini (6) süntees hüdrasiinhüdraadist (4) ja Fmoc-Cl-st (5).

80% hüdrasiinhüdraadi (4) vesilahus (12,1 ekv; 5,7 g; 143 mmol) kanti lämmastikuga täidetud ümarkolbi. Ümarkolbi lisati 50% atsetonitriil (ACN):dest H₂O lahus (20 ml) ning täideti uuesti lämmastikuga. Seejärel jahutati ümarkolb jäävannis 0 °C-ni. Samal ajal kaaluti uude ümarkolbi Fmoc-Cl (5) (1,0 ekv; 3,1 g; 11,8 mmol). Fmoc-Cl (5) lahustati ACN-is (200 ml) ja kanti üle tilklehtrisse. Tilklehter asetati hüdrasiinhüdraadi (4) lahusega täidetud ümarkolvile ning süsteem suleti septumi ja lämmastikuga täidetud õhupalliga. Fmoc-Cl (5) lahust lisati aeglaselt (umbes 0,5 tilka sekundis) hüdrasiinhüdraadi (4) lahusele (Skeem 15). Reaktsioonikeskkond hoiti 0 °C juures jäävanni abil. Kui kogu Fmoc-Cl (5) lahus oli lisatud, lasti reaktsioonil käia toatemperatuuril 30 min ning seejärel eemaldati lahusti vaakumis rotaatoraurusti abil. Seejärel asetati ümarkolb jäävanni ja lisati külma dest. H₂O (50 ml) ning kolbi jahutati jäävannil 10 min. Järgmiseks filtreeriti aine klaasfiltri ja filterpaberi abil, kasutades veejoapumpa. Saadud Fmoc-hüdrasiin (6) pesti 3 korda külma dest. veega (15 ml) ning 3 korda külma toluueniga (15 ml). Seejärel kuivatati produkti õhu käes petri tassil 16 h. Sünteesi saagis oli 91%. Saadud Fmoc-hüdrasiini (6) ¹H TMR spekter on lisas 6.

¹H TMR (700 MHz, DMSO-d₆, δ): 8,35 (s, 1H, NH); 7,89 (d, J = 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,70 (d, J = 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,42 (t, J = 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,33 (t, J = 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 4,29 (d, J = 7,7 Hz, 2H, CH₂(Fmoc)); 4,22 (t, J = 7 Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4,08 (s, 2H, NH₂).

3.2.2 N-Boc-3-bromopropüülamiini süntees



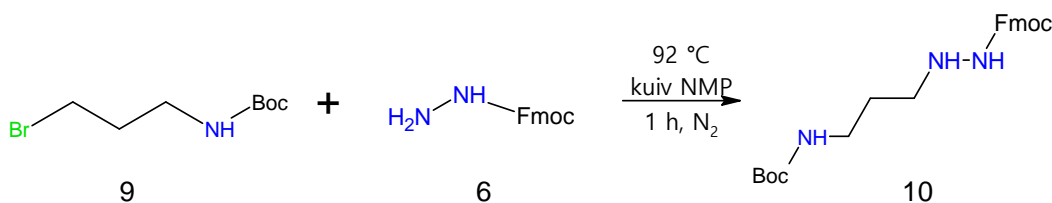
Skeem 16. N-Boc-3-bromopropüülamiini (9) süntees di-*tert*-butüüldikarbonaadist (8) ja 3-bromopropüül-ammooniumbromiidist (7).

Di-*tert*-butüüldikarbonaat (**8**) (1 ekv; 1,5 g; 7 mmol) kaaluti koonilisse kolbi ning lahustati DCM-is (20 ml). Ümarkolbi kaalutud 3-bromopropüülammooniumbromiidile (**7**) (1 ekv; 1,5 g, 7 mmol) lisati di-*tert*-butüüldikarbonaadi (**8**) lahus ning tilkhaaval DIPEA (2 ekv; 2,4 ml; 14 mmol). Reaktsioonil lasti käia 16 h (Skeem 16).

Seejärel lahjendati reaktsioonisegu etüülatsetaadiga (EA) (50 ml) ning kanti jaotuslehttrisse. EA lahust pesti küllast. NaHCO₃ lahuse (100 ml), dest. H₂O (50 ml) ning küllast. NaCl lahusega (50 ml). EA kiht kuivatati, kasutades vv. Na₂SO₄, ning lahusti eemaldati rotaatoraurusti abil vaakumis. Sünteesi saagis oli 98%. Saadud *N*-Boc-3-bromopropüülamiini (**9**) ¹H TMR spekter on lisas 7.

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 4,62 (s, 1H, NH); 3,42 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂); 3,26 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂); 2,03 (quint, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂); 1,43 (s, 9H: 3 × CH₃(Boc)).

3.2.3 *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N''*-Boc-propüül)hüdrasiini süntees



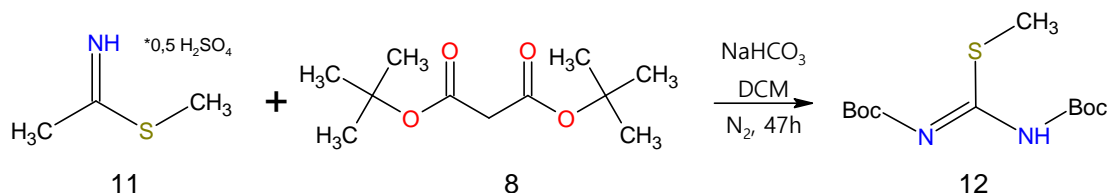
Skeem 17. *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N''*-Boc-propüül)hüdrasiini (**10**) süntees Fmoc-hüdrasiinist (**6**) ja *N*-Boc-3-bromopropüülamiinist (**9**).

Kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolbi kaaluti Fmoc-hüdrasiin (**6**) (3 ekv; 1,46 g; 5,7 mmol) ja *N*-Boc-3-bromopropüülamiin (**9**) (1 ekv, 0,45 g; 1,9 mmol). Seejärel täideti ümarkolb taaskord lämmastikuga ning reaktsioonisegu lahustati dest. NMP-s (4 ml). Reaktsioonisegu kuumutati õlivannis 92 °C juures tund aega (Skeem 17). Peale reaktsiooni jahutati reaktsioonisegu toatemperatuurini ning lahjendati EA-ga (100 ml) ja kanti jaotuslehttrisse. Orgaanilist faasi pesti küllast. NaHCO₃ lahuse (3 × 50 ml), dest. H₂O (3 × 50 ml) ning küllast. NaCl lahusega (50 ml). Orgaaniline faas kuivatati veevaba Na₂SO₄-ga ja lahusti eemaldati rotaatoraurusti abil vaakumis. Toorprodukti puhastamisel kolonnkromatograafiliselt ning TLC analüüsil kasutati eluendina EA-d (R_f = 0,71). Antud süntees ei osutunud edukaks, sünteesitud produkti TMR spektrid ja TLC analüüs ei vastanud oodatavatele tulemusele. Sünteesi viidi läbi 5 korda, kuid produkti ei õnnestunud sünteesida ühelgi korral, seega valiti alternatiivne sünteesirada. Ebaõnnestunud sünteesi produkti ¹H TMR spekter on lisas 8.

3.3 Asa-arginiini prekursori teine sünteesirada

Asa-Arg prekursori teine sünteesirada viidi läbi järgides Ref. [6] toodud eeskirja väikeste muudatustega.

3.3.1 *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea süntees



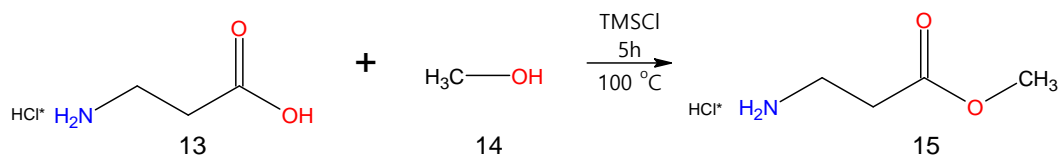
Skeem 18. *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea (12) süntees *S*-metüülisotiourea hemisulfaadist (11) ja di-*tert*-butüüldikarbonaadist (8).

Ümarkolvis lahustati *S*-metüülisotiourea hemisulfaat (11) (1 ekv; 10,0 g; 72 mmol) küllast. NaHCO₃ vesilahuses (200 ml). Järgmiseks lisati ümarkolbi DCM (100 ml) ja di-*tert*-butüüldikarbonaadi (8) (1,5 ekv; 22,7 g; 100 mmol) lahus DCM-is (100 ml). Reaktsioonil lasti toimuda 64 h intensiivse segamisega lämmastiku keskkonnas (Skeem 18).

Seejärel kanti segu jaotuslehttrisse, eraldati kihid ning veefaasi ekstraheeriti DCM-ga (3 × 50 ml). Orgaanilised faasid viidi kokku ning pesti küllast. NaCl lahusega (50 ml) ja orgaaniline kiht kuivatati veevaba Na₂SO₄ abil. *N*-Boc-*S*-metüülisotiourea ja *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea (12) eraldati kolonnkromatograafiliselt, kasutades eluendina 9:1 tolueeni:EA segu (TLC plaadil R_f = 0,65). *N*-Boc-*S*-metüülisotiourea pandi uuesti reageerima di-*tert*-butüüldikarbonaadiga (8) (0,38 ekv; 5,7 g; 25 mmol) DCM-i (50 ml) ja küllast. NaHCO₃ lahuses (50 ml), lämmastiku keskkonnas intensiivse segamisega. Reaktsioonil lasti käia 72 h, misjärel puhastati reaktsioonisegu eelnevalt kirjeldatud meetodil. Sünteesi saagis oli 76%. Sünteesitud *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea (12) ¹H TMR spekter on lisas 9.

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 11,59 (s, 1H, NH); 2,39 (s, 3H, S(CH₃)); 1,52 (s, 18H, 6 × CH₃ (2 × Boc)).

3.3.2 β -alaniini metüülestri vesinikkloriidi süntees

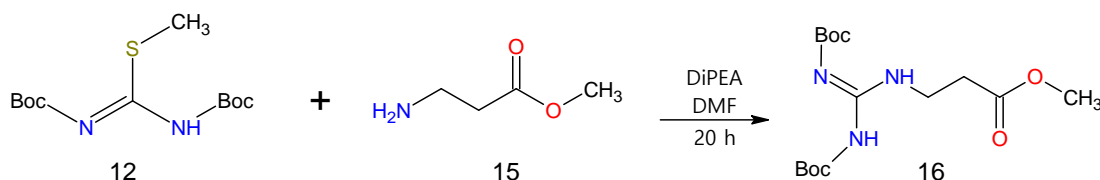


Skeem 19. β -alaniini metüülestri (**15**) vesinikkloriidi süntees β -alaniini vesinikkloriidist (**13**) ja MeOH-st (**14**).

β -alaniini vesinikkloriid (**13**) (1 ekv; 10,1 g; 80 mmol) ja MeOH (**14**) (19,5 ekv; 49,9 g; 1,6 mol) lisati ümarkolbi. Seejärel lisati reaktsioonisegule tilkhaaval TMSCl (2,2 ekv; 19,7 g; 181 mmol). Ümarkolvile asetati püstjahuti ning reaktsioonisegu kuumutati 100 °C õlivannis. Reaktsioonil lasti käia tagasijooksul 5 h (Skeem 19). Reaktsiooni peatamiseks eemaldati lahusti vaakumis rotaatoraurusti abil ning saadud valget sadet pesti tolueniga (3 \times 15 ml). Toluene eemaldati vaakumis rotaatoraurusti abil. Sünteesi saagis oli 100%. Sünteesitud β -alaniini metüülestri vesinikkloriidi (**15**) ^1H TMR spekter on lisas 10.

^1H TMR (700 MHz, D_2O , δ): 3,79 (s, 3H, O(CH₃)); 3,33 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂); 2,87 (t, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂).

3.3.3 Metüül-3-(N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaadi süntees



Skeem 20. Metüül-3-(N^ω, N^ω -di-Boc-guanidüül)propanaadi (**16**) süntees N,N' -di-Boc- S -metüülisotiouureast (**12**) ja β -alaniini metüülestri vesinikkloriidist (**15**).

β -alaniini metüülestri vesinikkloriid (**15**) (1,5 ekv; 12,0 g; 82 mmol) lahustati DMF-i (80 ml) ja DIPEA (2,5 ekv; 18,2 g; 140 mmol) lahuses. N,N' -di-Boc- S -metüülisotiouurea (**12**) (1 ekv, 15,7 g; 54 mmol) lahustati DMF-is (160 ml). N,N' -di-Boc- S -metüülisotiouurea (**12**) lahus DMF-is lisati ümarkolbi β -alaniini metüülestri vesinikkloriidi (**15**) lahusele DMF-is ning reaktsioonil lasti käia 20 h lämmastiku keskkonnas (Skeem 20).

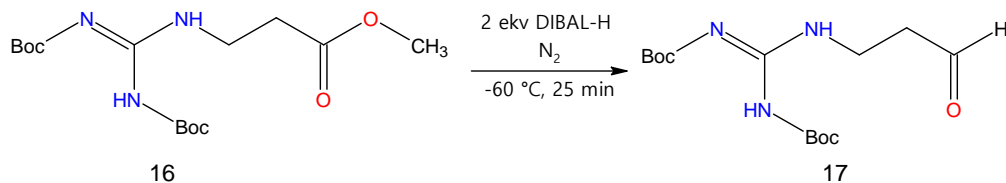
Reaktsiooni peatamiseks eemaldati DMF 2/3 ulatuses rotaatoraurusti abil vaakumis. Seejärel lahjendati reaktsioonisegu EA-ga (100 ml) ning pesti küllast. NaHCO_3 lahusega (100 ml). Küllast.

NaHCO₃ lahust ekstraheeriti EA-ga (10 × 50 ml). Orgaanilised kihid ühendati, pesti küllast. NaCl (100 ml) lahusega ning kuivatati veevaba Na₂SO₄ abil.

Metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadi (**16**) puhastamiseks tehti ümberkristallisatsioon MeOH-s (35 ml). Reaktsioonisegu lahustumisel filtreeriti lahus ümarkolbi, et vabaneda lahustumatutest lisanditest. Esimestel kristallidel lasti moodustuda toatemperatuuril ning edasiseks kristallisatsiooniks pandi segu 6 päevaks seisma 4 °C juurde. Seejärel filtreeriti kristallid veejoapumba abil ning loputati külma MeOH-ga (3 × 10 ml). Ümberkristallitud aine täiendaval puhastamisel kolonnkromatograafiliselt ja TLC analüüsil kasutati eluendina 1:3 EA:petrooleeter (PE) (*R*_f = 0,5). Sünteesi saagis oli 61%. Sünteesitud metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadi (**16**) ¹H TMR spektrid on lisades 11 - 13.

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 11,45 (s, 1H, NH); 8,70 (s, 1H, NH); 3,71 (q+s, J= 6,3 Hz, 5H: CH₂+O(CH₃)); 2,60 (t, J= 6,3 Hz, 2H, CH₂); 1,49 (s+s, 2 × 9H: 6 × CH₃(2 × Boc)).

3.3.4 *N*^ω, *N*^ω-di-Boc-3-guanidüülpropanaali süntees



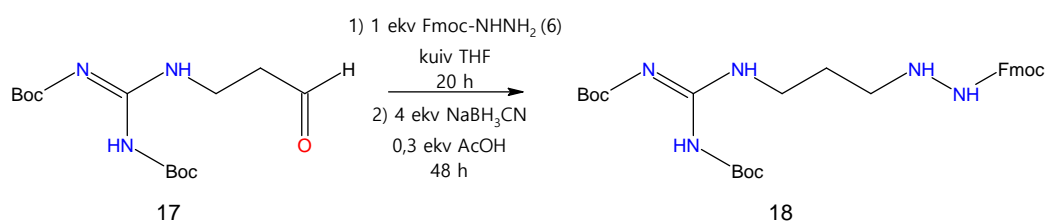
Skeem 21. *N*^ω, *N*^ω-di-Boc-3-guanidüülpropanaali (**17**) süntees metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül) propanaadist (**16**) DIBAL-H-ga.

Kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolvis lahustati metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaat (**16**) (1 ekv; 11,6 g; 34,0 mmol) kuivas kloroformis (232 ml) ning kolb täideti taas lämmastikuga. Seejärel suleti kolb septumi ja lämmastikuga täidetud õhupalliga. Reaktsiooninõu asetati tehnilise etanooliga täidetud jahutusvanni, mis varustati termomeetriga. Tehniline piiritus jahutati vedela lämmastiku abil -60 °C kraadini, seejärel lisati reaktsioonisegusse tilkhaaval 1 M DIBAL-H lahust heksaanis (2 ekv; 68,0 ml; 68,0 mmol). Reaktsiooni vältel lisati tehnilisse piiritusse pidevalt vedelat lämmastikku, et hoida reaktsioonisegu -60 °C juures. Reaktsioonil lasti toimuda 25 min (Skeem 21). Reaktsiooni peatamiseks lisati reaktsioonisegusse tilkhaaval MeOH-d (116 ml), misjärel segati seda veel 1 h toatemperatuuril. Selle aja jooksul tekkis reaktsioonisegusse valge sade.

Reaktsioonisegult aurustati lahusti rotaatoraurusti abil vaakumis ning toorprodukt lahustati EA-s (25 ml). Seejärel filtreeriti reaktsioonisegu uude ümarkolbi. Toorproduktilt aurustati lahusti rotaatoraurusti abil vaakumis ning seda puhastati kolonnkromatograafiliselt ja analüüsiti TLC abil, kasutades eluendina 1:3 EA:PE ($R_f = 0,25$). Reaktsiooni saagis oli 25%. Sünteesitud $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-3-guanidüülpropanaali (**17**) ^1H TMR spektrid on lisades 14 - 16.

^1H TMR (700 MHz, CDCl_3 , δ): 11,42 (s, 1H, NH); 9,82 (s, 1H, CHO); 8,6 (s, 1H, NH); 3,73 (q, $J_j = 6,3$ Hz, 2H, CH_2); 2,78 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2); 1,48 (s+s, $2 \times 9\text{H}$: $6 \times \text{CH}_3$ ($2 \times \text{Boc}$))

3.3.5 N -Fmoc- N' -(3- $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini süntees



Skeem 22. N -Fmoc- N' -(3- $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini (**18**) süntees $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-3-guanidüülpropanaalist (**17**) ja Fmoc-hüdrasiinist (**6**) NaBH₃CN abil.

Kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolvis lahustati Fmoc-hüdrasiin (**6**) (1 ekv; 1,622 g; 6,3 mmol) kuivas tetrahydrofuraanis (THF) (6 ml). Viaali kaalutud $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-3-guanidüülpropanaal (**17**) (1 ekv; 1,988 g; 6,3 mmol) lahustati samuti kuivas THF-is (12 ml) ning kanti süstla abil ümarkolbi. Reaktsioonil lasti intensiivse segamisega käia toatemperatuuril 20 h, misjärel lisati reaktsiooninõusse NaBH₃CN (4 ekv; 1,553 g; 24,7 mmol) ja äädikhape (0,9 ekv; 0,3 ml; 5,2 mmol). Reaktsioonil lasti käia veel intensiivse segamisega 48 h toatemperatuuril (Skeem 22).

Reaktsioonisegult eemaldati vaakumis rotaatoraurusti abil THF ning see lahustati EA-s (40 ml) ja kanti jaotuslehtrisse. Reaktsioonisegu pesti küllast. NaHCO₃ lahuse (50 ml) ja küllast. NaCl lahusega (50 ml). Orgaaniline faas kuivatati v.v. Na₂SO₄-ga ning EA aurustati rotaatoraurusti abil vaakumis. Seejärel lahustati reaktsioonisegu 96% etanoolis (200 ml) ning seda kuumutati tagasijooksul, kuni kogu boor-produkt kompleks oli lagunenu (jälgiti TLC abil, kasutades eluendina 2:1 EA:PE). Seejärel aurustati lahusti vaakumis rotaatoraurusti abil.

N -Fmoc- N' -(3- $N^\omega, N^{\omega'}$ -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini (**18**) üritati eraldada reaktsioonisegust kolonnkromatograafiliselt, kasutades eluendina 1:1 EA:PE ning ka teisi eluendisüsteeme, kuid

ükski ei osutunud edukaks. Seejärel prooviti eraldada *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiin (**18**) reaktsioonisegust kasutades *flash*-kromatograafiat ning eluenti 1:1 EA:PE, kuid see osutus edukaks vaid ühe lisandi eraldamisel, mitte produkti puhastamisel. TLC analüüsil kasutati eluendina 1:1 EA:PE segu ning produkti R_f väärtuseks saadi 0,5.

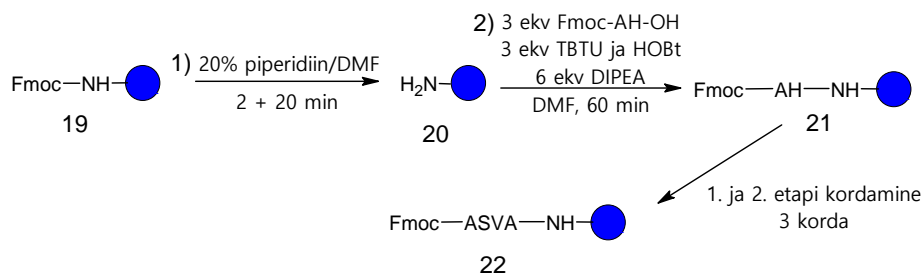
Reaktsioonisegule tehti HPLC-MS analüüs, saadud kromatogramm ja massispekter on lisas 17. Ühele eraldatud lisandile tehti ¹H ja ¹³C TMR analüüs, mille tulemused on lisades 18 ja 19

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 11,39 (s, 1H, NH); 8,59 (s, 1H, NH); 7,73 (d, J= 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,56 (d, J= 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,36 (t, J= 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,27 (t, J= 7 Hz, 2H, Ar(H)); 4,47 (s, 2H, CH₂(Fmoc)); 4,20 (s, 1H, CH(Fmoc)); 3,98 (q, J= 7 Hz, 1H, ROH); 3,54 (s, 2H, CH₂); 3,04 (s, 2H, CH₂); 2,60 (s, 1H, ROH); 2,05 (s, 1H, ROH); 1,82 (s, 1H, ROH); 1,79 (s, 2H, CH₂); 1,48 (s, 9H: 3 x CH₃(Boc)).

¹³C TMR (700 MHz, CDCl₃ δ): 171,2; 156,6; 153,2; 143,7; 141,4; 127,9; 127,2; 125,1; 120,1; 83,6; 77,3; 77,2; 77,0; 61,4; 60,4; 47,2; 38,8; 28,2; 28,1; 26,5; 21,09; 14,6; 14,5; 14,3.

3.4 Peptiidjärjestuse Fmoc-ASVA-vaik süntees

Peptiidiahel Fmoc-ASVA-vaik sünteesiti järgides Ref [33] toodud eeskirja väikeste muudatustega.



Skeem 23. Peptiidjärjestuse Fmoc-ASVA-vaik (**22**) süntees. Fmoc on Fmoc-kaitserühm, ● on tahke kandja, AH on järjestusse lisatav aminohappe, antud juhul Ala, Val või Ser.

Peptiidisünteesiks kaaluti filterkolonni Fmoc-Rink-Amiid MBHA vaik (**19**) (1 ekv; 250 mg; 0,17 mmol) ning sellel lasti punduda 20 min DCM-is (10 ml). Peale pundumist eemaldati vaigult Fmoc-kaitserühm alapeatüki 3.7 järgi. Fmoc-kaitserühma eemaldumist kontrolliti TLC testiga (ptk 3.7).

Eraldi katsutitesse kaaluti lisatav aminohape Fmoc-AH-OH (3 ekv, 0,51 mmol) ja lisatava aminohappe karboksüülrühma aktiveerivad aktivaatorid TBTU (3 ekv; 164 mg; 0,51 mmol) ning HOBt (3 ekv; 69 mg; 0,51 mmol). Fmoc-AH-OH, TBTU ja HOBt lahustati kõik DMF-is (3 × 1

ml) ja HOBti lahusesse lisati DIPEA (6 ekv; 0,18 ml; 1,2 mmol). Seejärel lisati HOBti ja DIPEA ning TBTU lahused lisatava aminohappe lahusele. Aktiveeritud aminohappe lahus lisati vaigule ning reaktsioonil lasti loksutil käia 60 min (Skeem 23), misjärel pesti vaiku lähteainete ja kõrvalproduktide eemaldamiseks DMF-iga (3 × 8 ml), DCM -iga (3 × 8 ml), DMF-iga (3 × 8 ml) ja DCM-iga (1 × 8 ml).

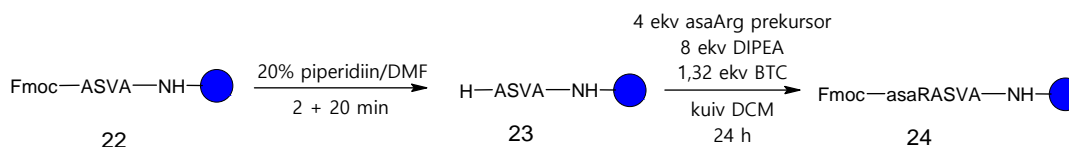
Reaktsiooni edukuse hindamiseks tehti Kaiseri test. Kui selle põhjal selgus, et reaktsioonisegus on veel vabu aminorühmasid, siis korrati aminohappe sidumist uute koguste reagentidega eelnevalt kirjeldatud meetodil.

Järgmiste aminohapete külge sidumist viidi läbi samamoodi nagu eelnevalt kirjeldatud, kasutades soovitud Fmoc-kaitstud aminohappeid (hetkel Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser-OH või Fmoc-Val-OH).

Peptiidjärjestuse Fmoc-ASVA-vaik (**22**) sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS abil. Selleks kaaluti proovikogus (~ 2 mg) vaiku filtriga süstlasse ning eemaldati peptiid vaigult koos püsivate kaitserühmadga alapeatüki 3.8 järgi. Proovi analüüsiti HPLC-MS abil, proov lahustati analüüsil kasutatavas eluendis. HPLC-MS kromatogramm ja massispekter on lisas 20.

3.5 Peptiidjärjestuse Fmoc-asaRASVA-vaik süntees

N-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül) hüdrasiin (asaArg prekursor, **16**) lisati peptiidiahelasse järgides Ref [33] toodud eeskirja väikeste muudatustega.



Skeem 24. AsaArg prekursori (**18**) lisamine peptiidiahelasse aktivaatoriga BTC. Fmoc on Fmoc-kaitserühm ning ● on tahke kandja.

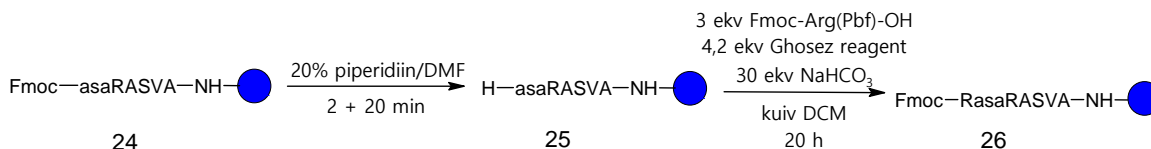
AsaArg lisamiseks peptiidjärjestusse kaaluti Fmoc-ASVA-vaik (**22**) (1 ekv; 0,144 g; 0,098 mmol) filterkolonni ning sellel lasti punduda DCM-is (5 ml) 20 min. Peale seda eemaldati Fmoc-kaitserühm alapeatüki 3.7 järgi. Samal ajal kaaluti kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolbi asaArg prekursor (**18**) (4 ekv; 216 mg; 0,39 mmol) ning see lahustati kuivas DCM-is (3 ml), misjärel lisati sellele DIPEA (8 ekv; 0,14 ml; 0,78 mmol). Seejärel lahustati aktivaator BTC (1,32 ekv; 27 mg; 0,13 mmol) kuivas DCM-is (0,5 ml). Ümarkolb asaArg prekursori (**18**) lahusega jahutati jäävannis 0 °C-ni, misjärel lisati BTC lahus tilkhaaval asaArg prekursori (**18**) lahusele. Reagentidel lasti reageerida 5 min 0 °C juures ning seejärel 30 min toatemperatuuril. Järgmisena

kanti aktiveeritud asaArg prekursori (**18**) lahus filterkolonni, kaitsmata H-ASVA-vaigule (**23**) ning lisati ka kuiv DCM (5 ml). Reaktsioonil lasti loksutil käia 24 h (Skeem 24) ning seejärel pesti vaiku DMF-ga (3 × 5 ml), DCM-ga (3 × 5 ml), DMF-ga (3 × 5 ml) ja DCM-ga (1 × 5 ml). Peale pesu tehti vaigule Kaiseri test, mis ei näidanud primaarsete aminorühmade olemasolu.

Peptiidjärjestuse Fmoc-asaRASVA-vaik (**24**) sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS abil. Selleks kaaluti proovikogus (~ 2 mg) vaiku filtriga süstlasse. Seejärel eemaldati peptiid tahkelt kandjalt kõikide püsivate kaitserühmadga alapeatüki 3.8 järgi. Proovi analüüsiti HPLC-MS abil, proov lahustati analüüsil kasutatavas eluendis. HPLC-MS kromatogramm ja massispekter on lisas 21.

3.6 Peptiidjärjestuse Fmoc-RasaRASVA-vaik süntees

Fmoc-Arg(Pbf)-OH lisati peptiidiahelasse järgides Ref [7] toodud eeskirja väikeste muudatustega.



Skeem 25. Arg ja asaArg vahelise asa-peptiidsideme süntees aktivaatoriga Ghosez reagent. Fmoc on Fmoc-kaitserühm ja ● on tahke kandja.

Arg lisamiseks peptiidiahelasse lasti Fmoc-asaRASVA-vaigul (**24**) punduda filterkolonnis, DCM-is (5 ml) 20 min. Seejärel eemaldati Fmoc-kaitserühm alapeatüki 3.7 järgi. Filterkolonni lisati kuiv NaHCO₃ (30 ekv; 246 mg; 2,9 mmol) ja kuiv DCM (5 ml) ning segul lasti loksuda 10 min. Samal ajal lahustati kuivatatud ja lämmastikuga täidetud ümarkolvis Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 ekv; 190 mg; 0,29 mmol) kuivas DCM-is (2 ml) ning lahus jahutati jäävannil 0 °C-ni. Fmoc-Arg(Pbf)-OH lahusele lisati tilkhaaval Ghosez reagent (4,2 ekv; 55 µl; 0,41 mmol) ning lahust segati 5 min 0 °C juures, seejärel lasti lahusel soojeneda toatemperatuurini. Aktiveeritud Fmoc-Arg(Pbf)-OH lahus kanti filterkolonni ning reaktsioonil lasti loksutil käia 20 h (Skeem 25). Peale reaktsiooni pesti vaiku DMF-ga (2 × 5 ml) ja DCM-ga (1 × 5 ml). Filterkolonnist võeti proovikogus (~ 2 mg) vaiku filtriga süstlasse. Seejärel pandi filterkolonni uued kogused lähteaineid peale (v.a NaHCO₃, mis juba oli süstlas) ja reaktsioonil lasti loksutil käia veel 20 h. Peale teistkordset reaktsiooni pesti vaiku DMF-ga (3 × 5 ml), MeOH-ga (3 × 5 ml), Milli-Q veega (3 × 5 ml), MeOH-ga (3 × 5 ml), DMF-ga (3 × 5 ml) ja DCM-ga (3 × 5 ml) ning proovikogus (~ 2 mg) vaiku kanti uude filtriga süstlasse.

Peptiidijärjestuse Fmoc-RasaRASVA-vaik (**26**) sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS abil. Analüüsi kahte proovi, millest esimene oli peale 20 h reaktsiooni toimumist ja teine peale uute koguste lähteainete lisamist ja veel 20 h reaktsiooni. Analüüsiks eemaldati peptiid tahkelt kandjalt püsivate kaitserühmadga alapeatüki 3.8 järgi. Proove analüüsiti HPLC-MS abil, proovid lahustati analüüsil kasutatavas eluendis. HPLC-MS kromatogrammid ja massispektrid on lisades 22 ja 23.

Peptiidi eemaldamiseks tahkelt kandjalt pandi filterkolonn Fmoc-RasaRASVA-ga (**26**) punduma 20 minutiks DCM-i (10 ml) ning sellelt eemaldati esmalt Fmoc-kaitserühm alapeatüki 3.7 järgi. Järgmiseks eemaldati peptiid tahkelt kandjalt koos püsivate kaitserühmadega alapeatüki 3.8 järgi. Peptiid lahustati minimaalses hulgas Milli-Q vees (4 ml) ning jahutati maha -78 °C-ni. Peptiidilt aurustati vesi lüofilisaatoris 24 h jooksul. Toorpeptiidi massiks saadi 73 mg ning HPLC-MS abil määrati selle puhtuseks 50 % 220 nm juures.

Toorpeptiidi HPLC-MS analüüsi kromatogramm ja massispekter on lisas 24.

Toorpeptiid puhastati preparatiivse pöördfaas HPLC abil. Selleks lahustati see HPLC-s kasutatavas voolutis (5% B). Voolutiks A oli 0,1% TFA Milli-Q vees ja voolutiks B oli 0,1% TFA ACN-is. Süstitud lahuse ruumala oli 300 – 400 µl. Puhtad asa-peptiidi fraktsioonid korjati tuubidesse, jahutati -78 °C-ni ning lüofiliseeriti 48 h jooksul. Puhastatud asa-peptiidi massiks saadi 18 mg ning HPLC järgi saadi puhtuseks 98% 220 nm juures.

Puhastatud peptiidi RasaRASVA HPLC-MS analüüsi kromatogramm ja massispekter on lisas 25.

3.7 Fmoc-kaitserühma eemaldamine peptiidilt

Fmoc-kaitserühma eemaldamiseks lisati peptiidile 20% piperidiini lahus DMF-is (filterkolonni 5 ml, filtriga süstlasse 2 ml). Reaktsioonil lasti loksutil käia 2 min, seejärel eemaldati 20% piperidiini lahus DMF-is, lisati sama kogus 20% piperidiini lahust DMF-is peale ning reaktsioonil lasti loksutil käia 20 min. Peale reaktsiooni peatamist eemaldati lahus ning vaiku pesti DMF-ga (5 × 5 ml filterkolonnis; 5 × 2 ml filtriga süstlas) ja DCM-ga (1 × 5 ml filterkolonnis; 1 × 2 ml filtriga süstlas). Eelmise aminohappe seostumise täiendavaks kontrolliks (lisaks Kaiseri testile) ning pesu efektiivsuse hindamiseks jälgiti TLC plaadil Fmoc-kaitserühma eemaldumisel tekkiva UV-aktiivse ühendi kadumist (TLC test).

3.8 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt

Vaik pandi punduma 20 min DCM-i (filterkolonnis 5 ml; filtriga süstlas 2 ml). Seejärel valmistati happeline lahus (95% TFA, 2,5% triisopropüülsilaan (TIS) ja 2,5% Milli-Q vesi), mida kanti peptiidile peale 2 ml 100 mg vaigu kohta, kuid mitte vähem, kui 1 ml. Reaktsioonil lasti loksutil käia 2 h, v.a kogu peptiidijärjestuse lõplikul eemaldamisel tahkelt kandjalt, kus reaktsioonil lasti käia 3 h. Peale reaktsiooni peatamist kanti TFA lahus tsentrifuugituubi, pool TFA-st aurustati õhuvoolus ning peptiidi sadestamiseks ja ekstraheerimiseks täideti tuub jääkülma dietüüleetri. Tuubi tsentrifuugiti peptiidi sadestamiseks ning eemaldati pealmine dietüüleetri kiht. Sadestamis-ekstraheerimisprotsessi viidi läbi 3 korda. Seejärel aurustati lahusti suruõhu abil, jättes tuubi vaid peptiidi.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Fmoc-Arg(Pbf)-OH sidumine Fmoc-asaArg-Phe-vaigule

Asa-peptiidi sünteesis on kõige kriitilisem etapp asa-aminohappejäägi *N*-terminaalile järgmise aminohappe lisamine. Enne asa-peptiidi H-RasaRASVA-NH₂ sünteesi tehti aktivaatori valiku osas testkatse (ptk 3.1), sünteesides mudelpeptiidi H-Arg-asaArg-Phe-NH₂. Eelkatseks vajalik asa-dipeptiid sünteesiti kasutades A. Troska sünteesitud asaArg prekursorit ptk 3.5 järgi. Arg ja asaArg vahelise peptiidsideme moodustamiseks katsetati kahte varasematest uuringutest [2,7] efektiivseimateks osutunud aktivaatorit: COMU ja Ghosez reagenti. COMU muundab lisatava aminohappe karboksüülrühma reaktsioonivõimelisemaks vastavaks oksümal põhinevaks aktiivseks estiks (Skeem 12) [14]. Ghosez reagent muundab lisatava aminohappe karboksüülrühma atsüülkloriidiks (Skeem 13) [35]. Mõlema aktivaatoriga lasti sidumisreaktsioonil käia loksutil 2 h (Skeem 14), misjärel pesti reaktsioonisegu ning võeti analüüsimiseks proovikogus vaiku. Seejärel lisati vaigule uued kogused lähteaineid peale ja reaktsioonil lasti loksutil veel käia 14 h peale mida analüüsiti reaktsiooni edukust HPLC-MS abil. Katse tulemusena selgus, et COMU ei ole nii efektiivne aktivaator asa-peptiidsideme moodustamiseks, kui seda on Ghosez reagent. Ühekordne lähteainete lisamine aktivaatori COMU kasutamise korral andis asa-tripeptiidi H-Arg-asaArg-Phe-NH₂ saagiseks vaid 2% (Lisa 2). Kahekordne lähteainete lisamine aktivaatori COMU korral ja reaktsiooni aja pikendamine suurendas ka tekkinud asa-tripeptiidi hulka 68%-ni (Lisa 4). Ghosez reagenti puhul andis ühekordne reagentide lisamine saagiseks 78% (Lisa 3) ning kahekordne reagentide lisamine tõstis reaktsiooni saagise 94%-ni (Lisa 5).

4.2 AsaArg prekursori süntees

Selleks, et sünteesida soovitud kogus H-RasaRASVA-NH₂, tuli sünteesida juurde ka asaArg prekursorit. AsaArg prekursorit hakati esialgu sünteesima, tuginedes A. Mastitski ja K. Kisseljova varasemalt väljatöötatud sünteesirajale [5], kuna antud sünteesirajas on kõige vähem etappe ning kõige suuremad saagised.

4.2.1 AsaArg prekursori süntees läbi asa-ornitiini

Esimesena sünteesiti hüdrasiinist ja Fmoc-Cl-ist Fmoc-hüdrasiin (ptk 3.2.1, Skeem 15). Monoasendatud Fmoc-hüdrasiini saamiseks oli hüdrasiin suures ülehulgas, reaktsiooni keskkonna temperatuur madal ning Fmoc-Cl lahust lisati hüdrasiinile tilkhaaval. Hüdrasiini ülehulk on vajalik ka reaktsiooni jooksul tekkiva vesinikloriidhappe sidumiseks. Reaktsiooni jooksul tekkis valge Fmoc-hüdrasiini sade, mis filtreeriti veejoapumba abil ning pesti jääkülma veega. Seejärel pesti Fmoc-hüdrasiini filtril külma toluueniga, et vabaneda veest ja mittepolaarsetest lisanditest. Sünteesi saagis oli 91%.

Teine sünteesitud lähteaine, oli *N*-Boc-3-bromopropüülamiin (ptk 3.2.2, Skeem 16). Süntees viidi läbi toatemperatuuril, segades omavahel DIPEA-ga aluseliseks muudetud keskkonnas di-*tert*-butüüldikarbonaadi ja 3-bromopropüülammooniumbromiidi. Aluselised tingimused on vajalikud 3-bromopropüülammooniumbromiidi soolast vaba aluse 3-bromopropüülamiini saamiseks ja reaktsiooni katalüüsamiseks. DIPEA ja di-*tert*-butüüldikarbonaat reageerivad omavahel ning moodustavad tugevalt elektrofiilse vaheühendi, mis reageerib 3-bromopropüülamiini nukleofiilse aminorühmaga. Sünteesi saagis oli 98%.

Järgmiseks kombineeriti kaks sünteesitud ühendit, et moodustada Fmoc-kaitstud asa-ornitiini prekursor (ptk 3.2.3, Skeem 17). See reaktsioon on kapriisne, kuna reaktsioon ei toimu alla 92 °C ning Fmoc-kaitserühm hakkab lagunema 94 °C juures. Antud reaktsioonietappi viidi läbi viis korda, kuid ükski kord ei suudetud asa-ornitiini prekursorit sünteesida ning seetõttu otsustati sünteesida asaArg prekursorit, tuginedes A. Mastitski ja A. Troska eelnevalt väljatöötatud sünteesirajale [6].

4.2.2 AsaArg prekursori süntees läbi guanidüülpropanaali

Esimesena sünteesiti *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea di-*tert*-butüüldikarbonaadist ja *S*-metüülisotiourea hemisulfaadist (ptk 3.3.1, Skeem 18). Antud reaktsioon on aeglane ning nõuab intensiivset segamist, kuna reaktsioonikeskkond koosneb DCM-ist ja küllast. NaHCO₃ vesilahusest – reaktsioon toimub vaid kahe faasi kokkupuutepinnal. Tekkinud produkt lahustub DCM-is. Antud reaktsioonil tekib kõrvalproduktina ka *N*-Boc-*S*-metüülisotiourea. See isoleeriti kolonnkromatograafiliselt ning pandi uuesti reageerima di-*tert*-butüüldikarbonaadiga, et suurendada *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea saagist. Sünteesi saagis oli 76%.

Järgmiseks sünteesiti β -alaniini metüülestri vesinikkloriid β -alaniini vesinikkloriidist (ptk 3.3.2, Skeem 19). Estrite moodustumisreaktsioonid on tasakaalulised ja alluvad Le Chatelier' printsiibile, seega β -alaniini metüülestri moodustumisel käitus MeOH nii lahusti kui ka suures ülehulgas oleva lähteainena. Lisaks nihutas tasakaalu β -alaniini metüülestri tekkimise suunas ka reaktsiooni käigus tekkiva vee elimineerimine TMSCl poolt. Lisaks katalüüsis TMSCl β -alaniini metüülestri teket, reageerides MeOH-ga ning andes reaktsioonivõimelisema metoksütrimetüülsilaani ja HCl. Sünteesi saagis oli 100%.

Kahest eelnevates etappides sünteesitud lähteainest sünteesiti järgmisena metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaat (ptk 3.3.3, Skeem 20). Reaktsiooni viidi läbi DIPEA poolt aluseliseks tehtud keskkonnas, et muuta β -alaniini metüülestri vesinikkloriid vabaks aluseks ehk β -alaniini metüülestriks. Reaktsiooni käigus ründab β -alaniini metüülestri aminorühm guanidileerivat reagenti ning moodustuvad guanidüülrühm ning metaantiool. Tekkinud metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaat puhastati kolonnkromatograafiliselt. Sünteesi saagis oli 61%.

Järgmiseks sünteesiti metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaal, redutseerides estrit DIBAL-H-ga (ptk 3.3.4, Skeem 21). Viies reaktsiooni läbi madalal temperatuuril (-60 °C) saab tagada reaktsiooni selektiivsuse, sest kõrgematel temperatuuridel redutseerib DIBAL-H aldehüüdi edasi alkoholiks. Reaktsioonisegu hoiti vedela lämmastikuga jahutatavas tehnilise piiratud vannis. Reaktsiooni lõpetamiseks ja vaheühendite lagundamiseks lisati reaktsioonikeskkonda MeOH-d. Metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaal puhastati kolonnkromatograafiliselt. Sünteesi saagis oli 25%.

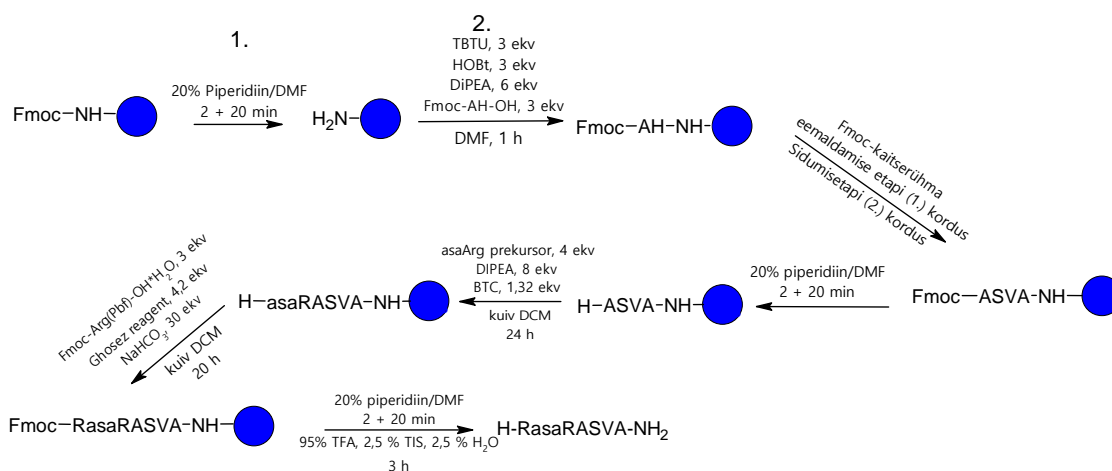
Metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaal pandi reageerima eelnevalt valmistatud Fmoc-hüdrasiiniga (ptk 3.2.1), et sünteesida asa-Arg prekursor N -Fmoc- N' -(3- N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiin (ptk 3.3.5, Skeem 22). Reaktsioon on küllaltki aeglane, sest Boc-kaitserühmade happelabiilsuse tõttu ei saa katalüüsiks kasutada happeid. Aldehüüdi ja hüdrasiini reaktsioonil moodustub hüdrasoon, mida redutseeritakse NaBH₃CN-ga tagasi hüdrasiiniks [29]. Lõpp-produkt moodustab booriga kompleksi ning boor-produkt kompleksi lagundamiseks keedeti reaktsioonisegu etanoolis.

Redutseerimisreaktsiooni käigus oli tekkinud produktile sarnaste omadustega kõrvalprodukt, seega katsed puhastada reaktsioonisegu kolonnkromatograafiliselt ja *flash*-kromatograafiliselt, kasutades erinevaid eluendisüsteeme, ei õnnestunud. Reaktsioonisegule tehti HPLC-MS analüüs (Lisa 17), mille abil suudeti kaks ainet tuvastada ning kinnitada, et produkt (asaArg prekursor) oli

tekinud. Toorprodukti siiski ei puhastatud preparatiivse HPLC-MS abil, kuna see ei lahustunud hästi pöördfaaskromatograafias kasutatavates polaarsetes eluentides, puhastatud asaArg prekursori hulk oleks olnud liiga väike, et sünteesi jätkata ning varasemast oli A. Troska sünteesitud asaArg prekursorit veel natuke järel. Aja surve tõttu otsustati jätkata A. Troska sünteesitud asaArg prekursoriga ja väiksema koguse H-RasaRASVA-NH₂ sünteesiga, mitte hakata asaArg prekursorit juurde sünteesima.

HPLC-MS abil tuvastati kõrvalprodukti molekulaariooni massi laengu suhe, milleks saadi 526,6. Kasutades *flash*-kromatograafiat, saadi üks puhas fraktsioon tekkinud kõrvalprodukti ning sellele tehti ¹H TMR (Lisa 18) ja ¹³C TMR (Lisa 19) analüüsid. TMR ja HPLC-MS spektrite põhjal selgus, et võib-olla on asaArg prekursori üks Boc-kaitserühm asendunud ühe boorhappe derivaadiga.

4.3 H-RasaRASVA-NH₂ süntees



Skeem 26. H-RasaRASVA-NH₂ sünteesirada. AH on aminohape (antud töös Ala, Ser või Val), ● on tahke kandja. Paralleelselt asaArg prekursori sünteesiga alustati H-RasaRASVA-NH₂ sünteesiga. H-ASVA-vaik sünteesis (ptk 3.4) lisati kõiki aminohappeid peptiidiahelasse kasutades aktivaatoreid TBTU ja HOBT. Lisatava aminohappe aktiveerimisel TBTU ja HOBT-iga tekib aminohappe bensotriasoolne vaheühend, mis on reaktsioonivõimelisem karboksüülhappest (Skeem 3) [39]. H-ASVA-vaik sünteesis lisati kõiki aminohappeid peptiidiahelasse üks kord, v.a seriini, mida lisati kaks korda. Aminohapete sidumisreaktsiooni edukust kontrolliti Kaiseri testi [38] ja TLC testi (ptk 3.7) abil. Peptiidiahela H-ASVA-NH₂ sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS abil. Peptiidiahela H-ASVA-NH₂ UV-Vis neelduvusomaduste parandamiseks analüüsiti seda HPLC-MS abil ilma selle *N*-terminaalilt Fmoc-kaitserühma eemaldamata (Fmoc-ASVA-NH₂, Lisa 20). Samuti ei olnud võimalik analüüsida

reaktsioonisaagiseid ja arvutada piikide pindalade suhteid, kuna Fmoc-kaitserühma ei kinnitatud peptiidijärjestuses eelnevalt reageerimata jäänud aminorühmadele tagasi, sest ei olnud kindlad, et Fmoc-kaitserühma kinnitub tagasi kõigile reageerimata jäänud aminorühmadele.

Seejärel seoti H-ASVA-vaik ahelasse asaArg prekursor (ptk 3.5), kasutades varasemalt väljatöötatud meetodit [33]. Eelpool kirjeldatud prekursori sünteesi ebaõnnestumise tõttu kasutati selles etapis eelnevalt A. Troska sünteesitud asaArg prekursorit, mida oli suhteliselt vähe järele jäänud. Seetõttu kasutati sünteesi jätkamiseks ka väiksemat vaigu kogust. Lisatav asaArg prekursor konverteeriti aktivaatori BTC abil reaktsioonivõimeliseks klooranhüdriidiks (Skeem 11) ning lisati H-ASVA-vaigule (Skeem 24). Kuna prekursori kogus oli piiratud, lisati seda üks kord ning reaktsioonil lasti loksutil käia 20 h, et saagis oleks maksimaalne. Peale reaktsiooni peatamist võeti proovikogus (~ 2 mg) vaiku HPLC-MS analüüsiks, et veenduda reaktsiooni edukuses. Analüüs näitas, et antud sünteesietapp oli edukas ja soovitud ühend oli tekkinud (Lisa 21).

Järgmiseks lisati Fmoc-Arg(Pbf)-OH H-asaRASVA-vaik peptiidiahelasse varasemalt väljatöötatud [7] ja asa-peptiidi mudelühendis testitud meetodil (ptk 3.1), kasutades aktivaatorina Ghosez reagenti. Lisatava aminohappe aktiveerimisel Ghosez reagentiga konverteeritakse aminohappe karboksüülrühm atsüülhaliidiks (ptk 3.6, Skeem 13), mis on reaktsioonivõimelisem, kui karboksüülhape (Skeem 25). Antud reaktsiooni viidi läbi kaks korda, kuna eelkatse näitas, et reaktsioon kulgeb edasi peale lähteainete juurde lisamist. Seekord lähteainete teistkordne lisamine produkti juurde ei andnud (Lisad 22 ja 23). Võib arvata, et lähteainete teistkordne lisamine ei suurendanud reaktsiooni saagist, kuna Fmoc-RasaRASVA-vaik sünteesi esimesel sidumisreaktsioonil lasti käia kauem, kui eelkatses ning reaktsioonisaagis oli kõrge juba peale esimest korda lähteainete lisamist. Peale sidumisetappi oli HPLC-MS analüüsil näha ka lisandit Fmoc-RASVA-NH₂, mis viitab sellele, et asaArg sidumisreaktsioon ei läinud lõpuni ning Fmoc-Arg-OH kinnitus asaArg-ga eelnevalt reageerimata jäänud H-ASVA-vaik *N*-terminaalile (Lisad 22 ja 23). Kõikide aminohapete sidumisreaktsioonide tingimused ja kvalitatiivsete analüüsitud tulemused on Lisas 26.

Seejärel eemaldati peptiid tahkelt kandjalt happelise lahusega. Toorpeptiidi puhtuseks määrati HPLC-MS abil 50% (Lisa 24). Toorpeptiidi puhastati preparatiivse pöördfaas HPLC abil ning tulemuseks saadi kõrge puhtusega (98%) peptiid H-RasaRASVA-NH₂ (Lisad 25 ja 28). Antud töös saadi asa-peptiidsünteesi kohta võrdlemisi kõrge saagis (Lisa 26), vaatamata proovide analüüsimisest tulenevatest kadudest. Meie teadusgrupis varasemalt sünteesitud H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂ asa-peptiidide eraldatud saagised, kasutades asa-peptiidsideme moodustamisel aktivaatorit COMU, jäid 1-2% juurde [40], kuid selles töös saadi lõplikuks saagiseks 16%. Sellest võib järeldada, et Ghosez reagent on praegu teadaolevalt efektiivseim aktivaator asa-peptiidsideme moodustamiseks.

Kokkuvõte

Antud töö eesmärk oli sünteesida SPPS eeskirja järgi proteiinkinaas A minimaalse substraadi RRASVA asa-analoog RasaRASVA. Peptiidiahela ASVA sünteesiks kasutati peptiidisünteesis laialt levinud aminohapete aktivaatoreid TBTU ja HOBt, asaArg prekursori lisamiseks peptiidiahelasse kasutati aktivaatorit BTC ning Arg ja asaArg vahelise asa-peptiidsideme sünteesiks kasutati aktivaatorit Ghosez reagent. Tulemuseks saadi võrdlemisi hea saagise ja puhtusega asa-peptiid H-RasaRASVA-NH₂.

Rakendades SPPS meetodikat peptiidisünteesiks ja Ghosez reagenti asaArg-le lisatava Arg karboksüülrühma aktiveerimiseks asa-peptiidi RasaRASVA sünteesil saadi küllaltki kõrge saagis võrreldes varasemalt meie teadusgrupis sünteesitud asa-asendatud RRASVA analoogidega. Edaspidi võib veel täiendavalt optimeerida reaktsioonitingimusi, näiteks reaktsiooniaega ning kasutatavate reagentide koguseid Ghosez reagenti kasutamisel. Lisaks võib uurida ka Ghosez reagenti efektiivsust asa-peptiidsideme moodustumisel varieerides amino- kui asa-aminohappe külgrühma struktuuri, kuna hetkel on Ghosez reagent teadaolevalt üks tõhusamaid aktivaatoreid selle moodustamiseks.

Summary

The objective of the thesis was to synthesize RasaRASVA, an aza-analogue of protein kinase A minimal substrate RRASVA, using SPPS protocol. The peptide chain ASVA was synthesized by using TBTU and HOBt for amino acid activation, which are commonly used coupling reagents in peptide synthesis. AsaArg was incorporated into the peptide chain by using an acylating activator BTC. The aza-peptide bond between Arg and AsaArg was synthesized by using Ghosez reagent as an activator. As a result of the thesis, H-RasaRASVA-NH₂ was obtained with relatively good yield and purity.

By employing SPPS methods for peptide synthesis and Ghosez reagent to activate the carbonyl group of the Arg, which was coupled to the asaArg residue, the aza-peptide RasaRASVA was synthesized with relatively good yield and purity compared to other aza-analogues of RRASVA previously synthesized by our research group. It is possible to further optimize reaction conditions, for example reaction time and reagent quantities when using Ghosez reagent. The effectiveness of Ghosez reagent in synthesizing other RRASVA aza-analogues should also be studied, because the Ghosez reagent is currently one of the most effective activators known for aza-peptide bond formation.

Kasutatud kirjandus

1. 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. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.74>.
2. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (35), 3421–3425. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.07.063>.
3. Arujõe, M.; Ploom, A. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (21), 2010–2013. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.021>.
4. Troska, A.; Arujõe, M.; Mastitski, A.; Järv, J.; Ploom, A. Steric Impact of Aza-Amino Acid on Solid-Phase Aza-Peptide Bond Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2021**, *69*, 152973. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.152973>.
5. 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. <https://doi.org/10.3176/proc.2014.4.09>.
6. Mastitski, A.; Troska, A.; Järv, J. Synthesis of N ω ,N ω -Di-Boc-3-Guanidylpropanal - An Important Reagent for Synthesis of Aza-Arg Precursors. **2021**. *Organic Preparations and Procedures International*, *53*(5), 472–478. <https://doi.org/10.1080/00304948.2021.1967022>
7. Proulx, Caroline. Aza-Amino Acids Disrupt β -Sheet Secondary Structures. *Molecules* **2019**, *24* (10), 1919. <https://doi.org/10.3390/molecules24101919>.
8. John L. Tymoczko; Jeremy M. Berg; Lubert Stryer. *Biokeemia Lühikursus*; TTÜ kirjastus: Tallinn; **2016**.
9. Fischer, E.; Fourneau, E. Ueber Einige Derivate Des Glykocolls. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34* (2), 2868–2877. <https://doi.org/10.1002/cber.190103402249>.
10. Paul Lloyd-Williams; Fernando Albericio; Ernest Giralt. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; **1997**.
11. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
12. Malešević, M. [Beta]-Amino [Beta-Amino] Acids as Secondary Structure Inducers in Peptides [Elektronische Ressource] /. **2002**.
13. Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem Soc Rev* **2009**, *38* (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/B701677H>.
14. El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
15. Duengo, S.; Muhajir, M. I.; Hidayat, A. T.; Musa, W. J. A.; Maharani, R. Epimerisation in Peptide Synthesis. *Molecules* **2023**, *28* (24), 8017. <https://doi.org/10.3390/molecules28248017>.
16. Czarnecka, K.; Pilarz, A.; Rogut, A.; Maj, P.; Szymańska, J.; Olejnik, Ł.; Szymański, P. Aspartame— True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products. *Nutrients* **2021**, *13* (6), 1957. <https://doi.org/10.3390/nu13061957>.
17. Ngoc, L. T. N.; Moon, J.-Y.; Lee, Y.-C. Insights into Bioactive Peptides in Cosmetics. *Cosmetics* **2023**, *10* (4), 111. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10040111>.
18. Wang, L.; Wang, N.; Zhang, W.; Cheng, X.; Yan, Z.; Shao, G.; Wang, X.; Wang, R.; Fu, C. Therapeutic Peptides: Current Applications and Future Directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.
19. The Insight Partners. *Peptide Therapeutics Market to Grow at 9.2% CAGR by 2027*. Peptide Therapeutics Market is expected to reach US\$ 50,003.15 million by 2027. <https://www.theinsightpartners.com/pr/peptide-therapeutics-market> (accessed 2024-05-10).
20. Hess, H.-Jürgen.; 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,1 an Isostere of Bovine Angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (24), 4040–4041. <https://doi.org/10.1021/ja00907a036>.
21. Ploom, A.; Mastitski, A.; Arujõe, M.; Troska, A.; Järv, J. Aza-Peptides: Expectations and Reality. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2022**, *71* (3), 241. <https://doi.org/10.3176/proc.2022.3.05>.

22. Gante, J. Azapeptides. *Synthesis* **1989**, 21 (6), 405–413. <https://doi.org/10.1055/s-1989-27269>.
23. 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. <https://doi.org/10.1021/cc050043h>.
24. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12 (3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>.
25. Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (10), 3575. <https://doi.org/10.1039/c3cs60384a>.
26. Harrison, T. S.; Scott, L. J. Atazanavir. *Drugs* **2005**, 65 (16), 2309–2336. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565160-00010>.
27. Chrisp, P.; Goa, K. L. Goserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, an clinical use in sex hormone-related conditions. *Drugs*. **1991**, 41(2):254-88. doi: 10.2165/00003495-199141020-00008. PMID: 1709853.
28. Bondebjerg, J.; Fuglsang, H.; Valeur, K. R.; Kaznelson, D. W.; Hansen, J. A.; Pedersen, R. O.; Krogh, B. O.; Jensen, B. S.; Lauritzen, C.; Petersen, G.; Pedersen, J.; Nærum, L. Novel Semicarbazide-Derived Inhibitors of Human Dipeptidyl Peptidase I (hDPPi). *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13 (14), 4408–4424. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.048>.
29. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (12), 2897–2904. <https://doi.org/10.1021/ja00741a013>.
30. Sokolova, T. A.; Zapevalova, N. P. Acylation of Hydrazine and Its Substituted Derivatives with Derivatives of α -u Hsaturated Monobasic Acids. *Russ. Chem. Rev.* **1969**.
31. 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. <https://doi.org/10.1021/jo102422x>.
32. Höck, S.; Marti, R.; Riedl, R.; Simeunovics, M. Thermal Cleavage of the Fmoc Protection Group. *Chimia* **2010**, 64, 200–202. <https://doi.org/10.2533/chimia.2010.200>.
33. Härk, H. H.; Troska, A.; Arujõe, M.; Burk, P.; Järv, J.; Ploom, A. Kinetic Study of Aza-Amino Acid Incorporation into Peptide Chains: Influence of the Steric Effect of the Side Chain. *Tetrahedron* **2022**, 129, 133161. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2022.133161>.
34. Busnel, O.; Bi, L.; Dali, H.; Cheguillaume, A.; Chevance, S.; Bondon, A.; Muller, S.; Baudy-Floc'h, M. Solid-Phase Synthesis of “Mixed” Peptidomimetics Using Fmoc-Protected Aza-B β -Amino Acids and α -Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (26), 10701–10708. <https://doi.org/10.1021/jo051585o>.
35. Marx, D.; Wingen, L. M.; Schnakenburg, G.; Müller, C. E.; Scholz, M. S. Fast, Efficient, and Versatile Synthesis of 6-Amino-5-Carboxamidouracils as Precursors for 8-Substituted Xanthines. *Front. Chem.* **2019**, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00056>.
36. Devos, A.; Remion, J.; Frisque-Hesbain, A.-M.; Colens, A.; Ghosez, L. Synthesis of Acyl Halides under Very Mild Conditions. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, No. 24, 1180. <https://doi.org/10.1039/c39790001180>.
37. Zhang, L.; Wang, X.; Wang, J.; Grinberg, N.; Krishnamurthy, D.; Senanayake, C. H. An Improved Method of Amide Synthesis Using Acyl Chlorides. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50 (24), 2964–2966. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.03.220>.
38. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34 (2), 595–598. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6).
39. Sturabotti, E.; Vetica, F.; Toscano, G.; Calcaterra, A.; Martinelli, A.; Migneco, L. M.; Leonelli, F. N-Acetyl-L-Phenylalanine Racemization during TBTU Amidation: An In-Depth Study for the Synthesis of Anti-Inflammatory 2-(N-Acetyl)-L-Phenylalanyl-amido-2-Deoxy-D-Glucose (NAPA). *Molecules* **2023**, 28 (2), 581. <https://doi.org/10.3390/molecules28020581>.
40. Egle Truuman. Proteiinkinaas A Substraadi RRASVA Asa-Analoogide Süntees Aktivaatoriga COMU, Tartu Ülikool, **2018**.

Lisad

LISA 1 – Kasutatud reagentid ja töövahendid

Reagent	MW (g/mol)	Puhtus	Tootja
3-bromopropüül- ammooniumbromiid	218,9	> 98%	Sigma-Aldrich
β -alaniini vesinikkloriid	125,5	> 99,0%	Sigma-Aldrich
AsaArg prekursor	553,7	~ 95 %	A. Troska
Atsetonitriil	41,1	> 99,9%	Honeywell
BTC	296,8	> 98%	Sigma-Aldrich
COMU	428,3	> 97%	Acros Organics
Diklorometaan	84,9	> 99,9%	Honeywell
DiBAL-H 1M lahus heksaanis	142,2	DiBAL-H kontsentratsioon 1M heksaanis	Thermo Fisher Scientific
DIPEA	129,3	> 98%	Fluka
Di- <i>tert</i> -butüüldikarbonaat	218,3	> 99%	Sigma-Aldrich
Etüülatsetaat	88,1	> 99,8%	Fisher Scientific
Fluorenüülmetoksü- karbonüülkloriid	258,7	> 98%	Novabiochem
Fmoc-L-alaniin	311,3	> 99%	Iris Biotech
Fmoc-L-arginiin(Pbf)	648,8	> 99%	Iris Biotech
Fmoc-L-seriin(tBu)	383,4	> 99%	Iris Biotech
Fmoc-L-valiin	339,4	> 99%	Carbosynth
Ghosez reagent	133,6	> 98,5%	Thermo Fisher Scientific

HOBt	135,1	> 97%	Sigma-Aldrich
Hüdrasiinhüdraadi 80% vesilahus	32,0	Hüdrasiinhüdraadi 80% vesilahus	Fisher Scientific
KMnO ₄	158,0	> 99,0%	Sigma-Aldrich
Kloroform	119,4	> 99,5%	Fisher Scientific
Metanool	32,0	> 99,8 %	Sigma-Aldrich
NaCl	58,4	> 99%	Sigma-Aldrich
NaHCO ₃	84,0	> 99,7%	Sigma-Aldrich
NMP	99,1	> 99,5%	Thermo Fisher Scientific
<i>N,N</i> -dimetüülformamiid	73,1	> 99,9%	Honeywell
Na ₂ SO ₄ (veevaba)	142,0	> 95%	Lach-ner
Petrooleeter	-	> 99,0 %	Honeywell
Piperidiin	85,1	> 99%	Sigma-Aldrich
Rink amiid MBHA vaik	Loading 0,68 mmol/g	-	Novabiochem
<i>S</i> -metüültiourea hemisulfaat	139,2	> 98%	Sigma-Aldrich
TBTU	321,1	≥ 98%	Sigma-Aldrich
TCFH	280,6	> 98%	Sigma-Aldrich
THF	72,1	> 99,9%	Sigma-Aldrich
TFA	114,0	> 99,5%	Iris Biotech
Triisopropüülsilaan	158,4	> 98%	Sigma-Aldrich
Trimetüüsilüülkloriid 1 M lahus THF-is	85,9	1 M lahus THF-is	Sigma-Aldrich
Tolueen	92,1	> 99,5%	Sigma-Aldrich

Õhukese kihi kromatograafia (TLC) analüüsid tehti Macherey-Nageli toodetud modifitseerimata silikageeli plaatide abil (põori suurus: 60 Å; osakese suurus: 5-17 µm). TLC plaatide indikaatoriks on mangaan-aktiveeritud tsinksilikaat, mis fluorestseerub roheliselt (254 nm juures). Laigud visualiseeriti UV-kiirgusega (254 nm) või happelise KMnO₄ lahusega.

Kolonnkromatograafia tahke faasina kasutati Macherey-Nageli toodetud modifitseerimata silikageeli (põori suurus: 60 Å; osakese suurus: 63 - 200 µm).

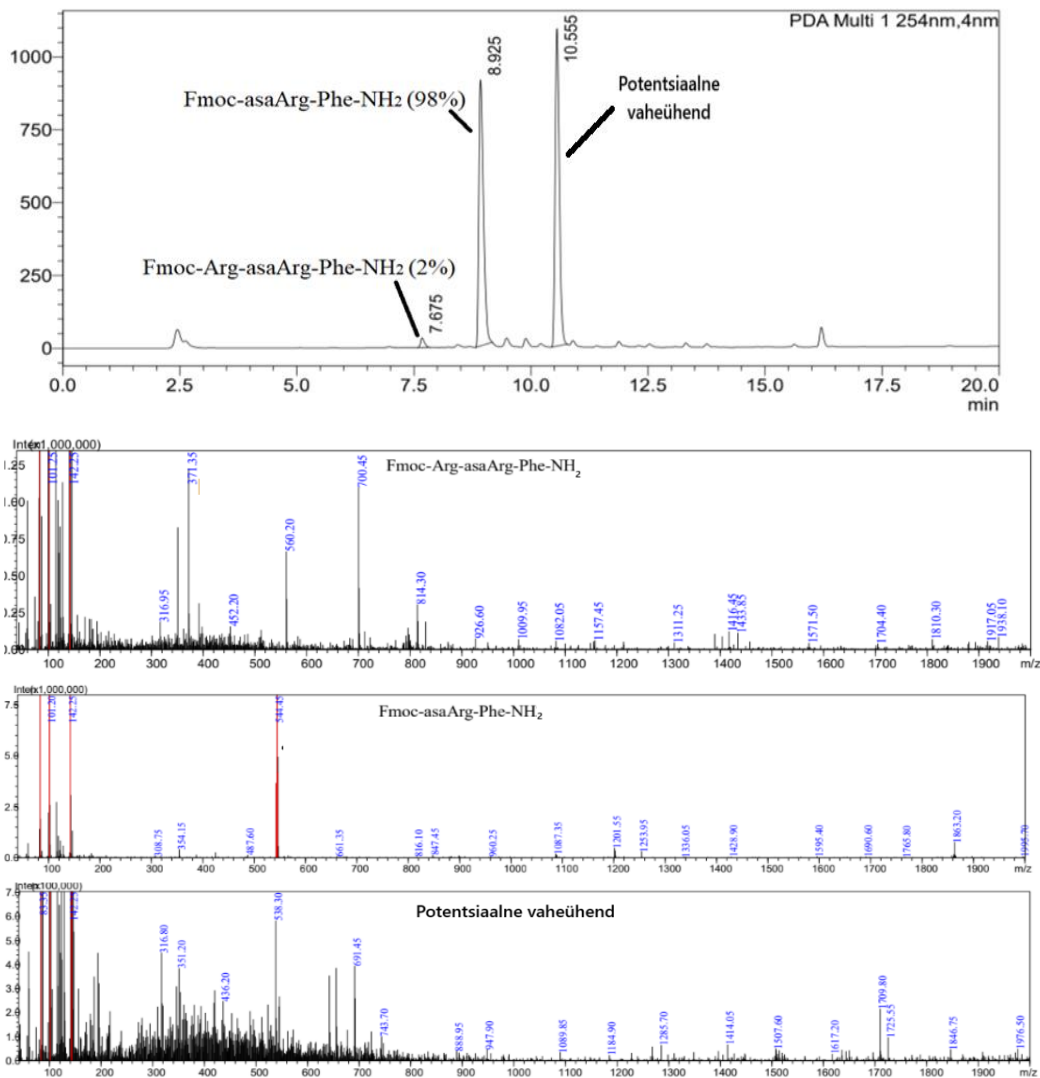
Tuumamagnetresonants (TMR) mõõtmised teostati Bruker Avance-III 700 MHz TMR spektromeetril.

HPLC-MS analüüsidel kasutati Shimadzu toodetud pumpasid LC-20AD, massidetektorit LCMS-2020 ning UV-Vis detektorit SPD-M20A. Statsionaarse faasina kasutati pöördfaaskoloni Phenomenex Kinetex 5 µm EVO (C₁₈, 100 Å, 250 × 4,6 mm). Massispektrit mõõdeti positiivses ionisatsiooni mõõtmisrežiimis, kus oli ionisatsiooniallikaks elektropihustusionisatsioon (ESI). Proove voolutati voolukiirusel 1 ml/min. Andmete töötamiseks kasutati programmi LabSolutions Version 5.82 SP1.

H-RasaRASVA-NH₂ puhastamiseks kasutati Shimadzu toodetud pumpasid LC-20AD ning UV-Vis detektorit SPD-M20A. Statsionaarse faasina kasutati pöördfaaskoloni Phenomenex Luna 10 µm (C₁₈(2), 100 Å, 250 × 21 mm). Proove voolutati voolukiirusel 5 ml/min. Andmete töötamiseks kasutati programmi LabSolutions Version 5.82 SP1.

HPLC-s kasutati mõlemal juhul kahest lahusest koosnevat gradiendiprogrammi. Lahus A oli 0,1% TFA Milli-Q puhtusega vees ning lahus B oli 0,1% TFA ACN-is.

LISA 2 – Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ kromatogramm ja massispekter (aktivaator COMU, lähteaineid lisatud üks kord, reaktsiooni aeg 2 h)



Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 699,8 m/z; [M+H] = 700,8 m/z; [M+ACN+2H]/2 = 371,4 m/z

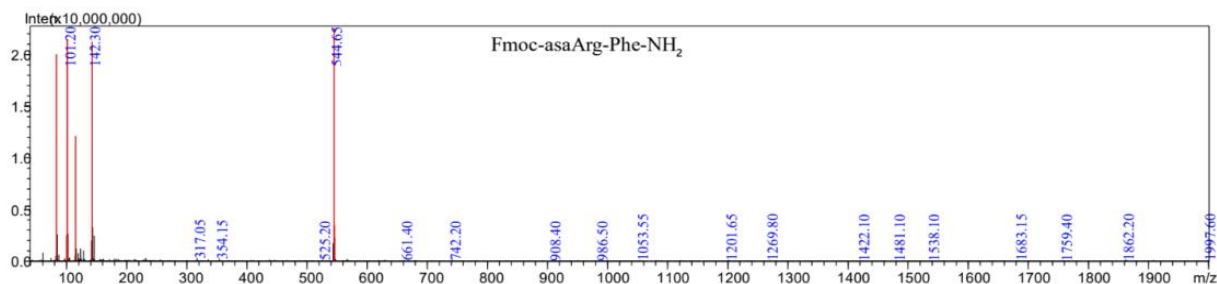
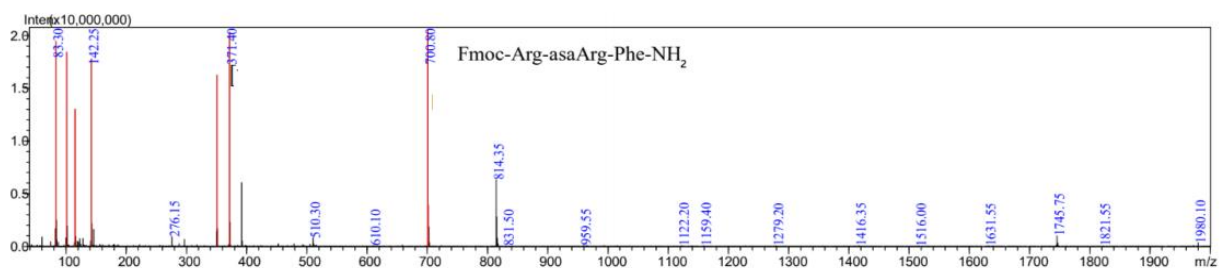
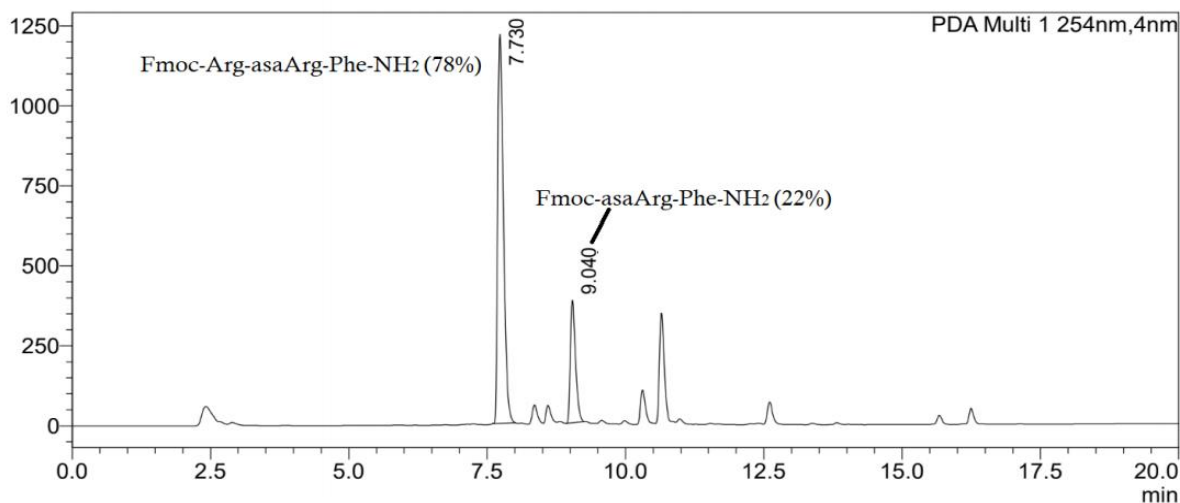
Fmoc-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 543,6 m/z; [M+H] = 544,6 m/z

Reaktsioonisaagised arvutati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Reaktsioonisegu lahustati 20% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 20% B; 2 min – 20% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 20% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl.

LISA 3 – Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ kromatogramm ja massispekter (aktivaator Ghosez reagent, lähteaineid lisatud üks kord, reaktsiooni aeg 2 h)

mAU



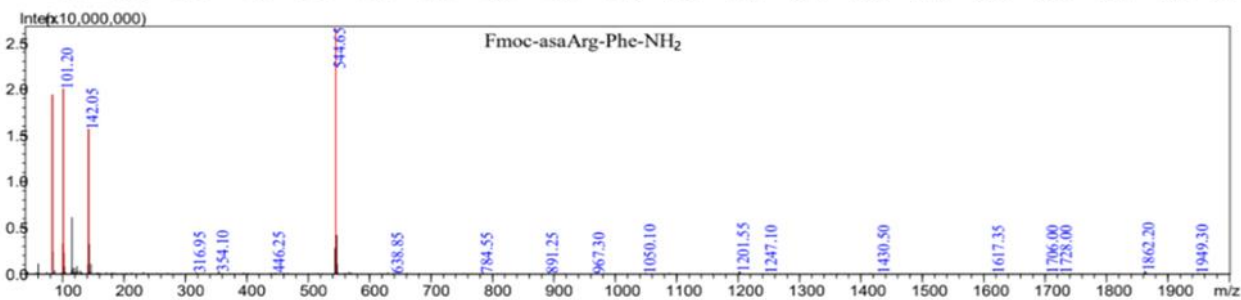
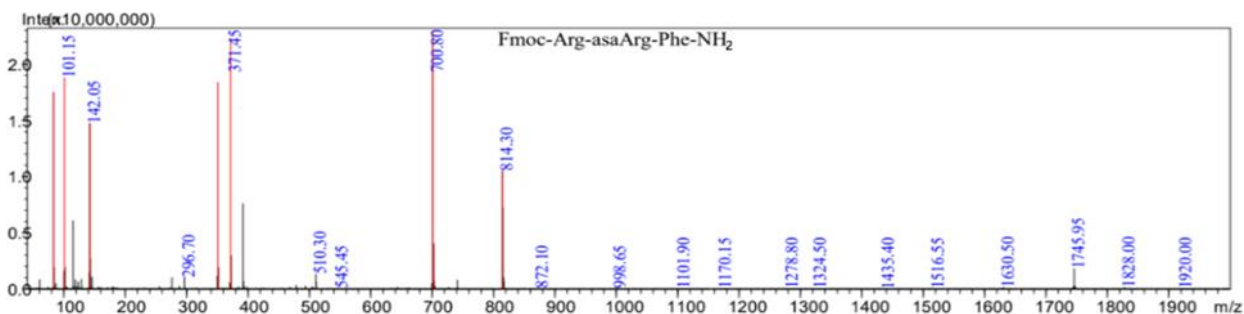
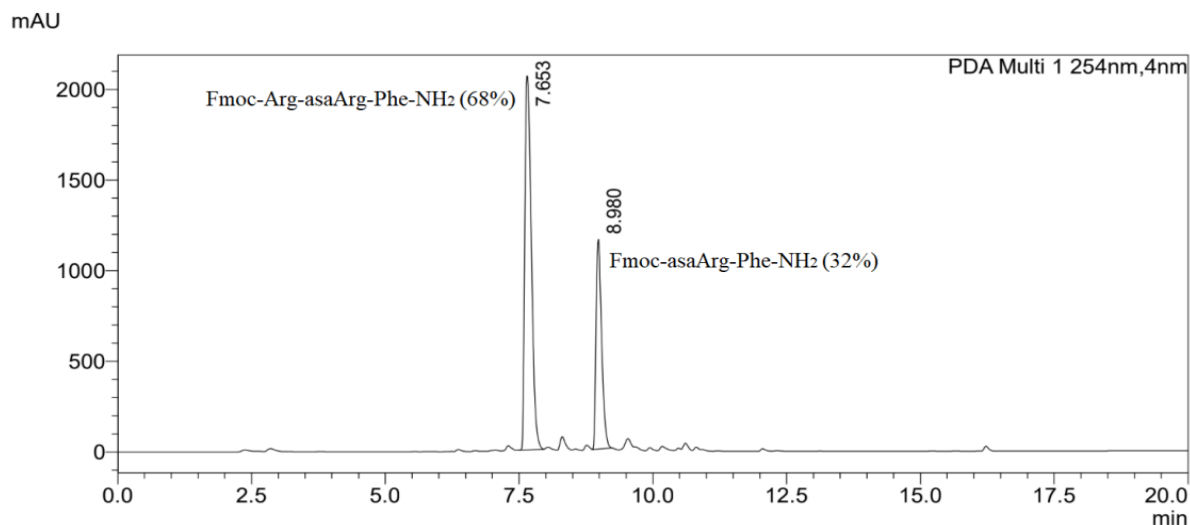
Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 699,8 m/z; [M+H] = 700,8 m/z; [M+ACN+2H]/2 = 371,4 m/z

Fmoc-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 543,6 m/z; [M+H] = 544,6 m/z

Reaktsioonisaagised arvutati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Reaktsioonisegu lahustati 20% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 20% B; 2 min – 20% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 20% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl.

LISA 4 – Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ kromatogramm ja massispekter (aktivaator COMU, lähteaineid lisatud 2 korda, reaktsiooni aeg 16 h)



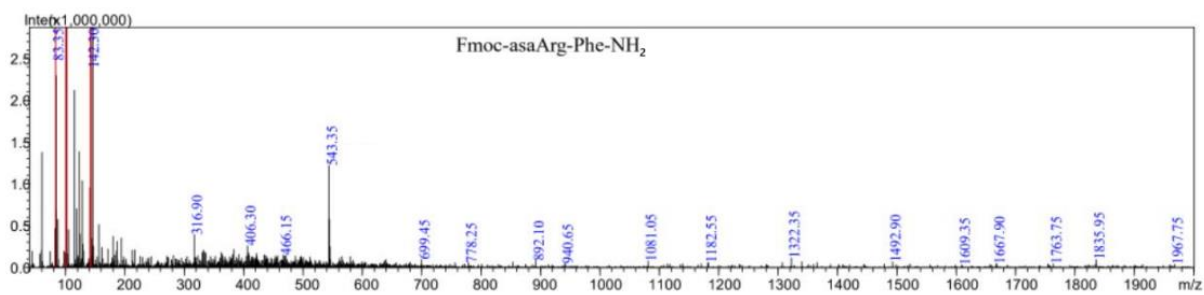
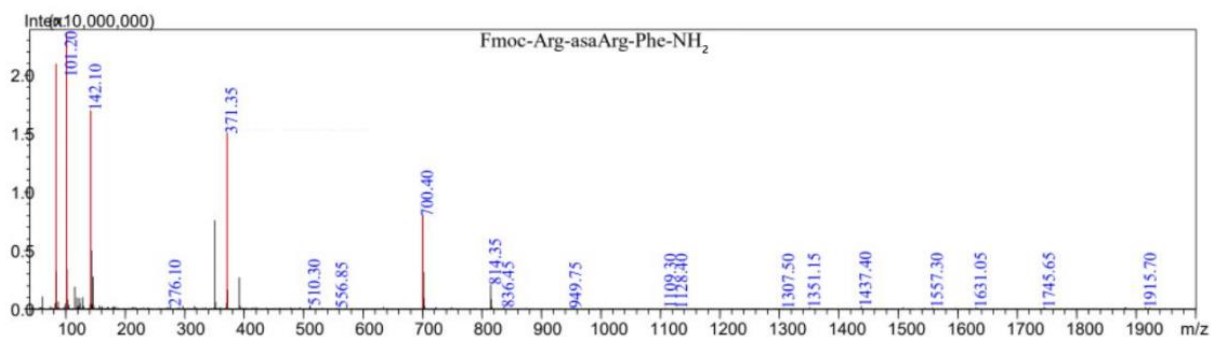
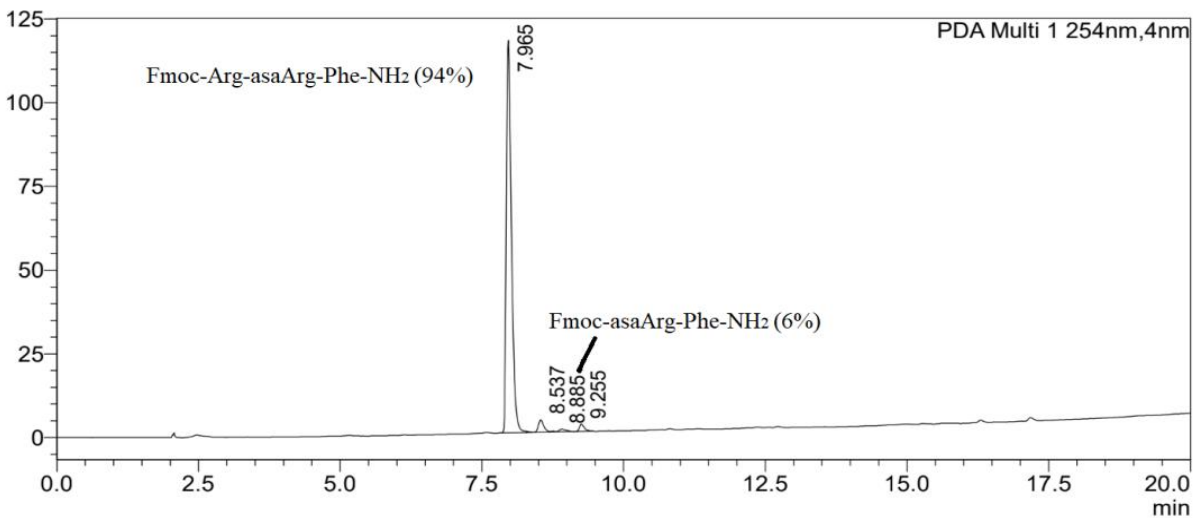
Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 699,8 m/z; [M+H] = 700,8 m/z; [M+ACN+2H]/2 = 371,4 m/z

Fmoc-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 543,6 m/z; [M+H] = 544,6 m/z

Reaktsioonisaagised arvutati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Reaktsioonisegu lahustati 20% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 20% B; 2 min – 20% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 20% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl.

LISA 5 – Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ kromatogramm ja massispekter (aktivaator Ghosez reagent, lähteaineid lisatud 2 korda, reaktsiooni aeg 16 h)



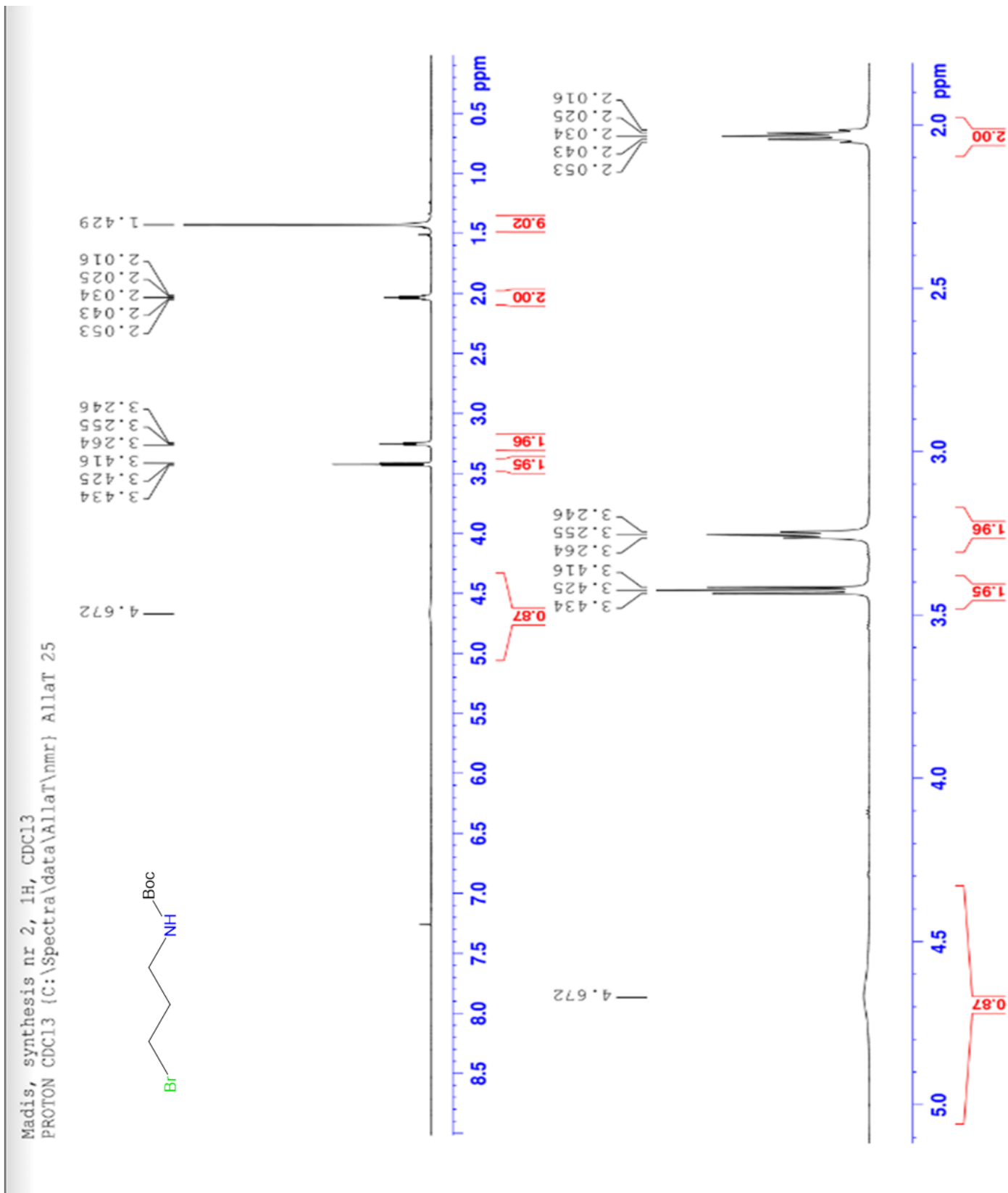
Fmoc-Arg-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 699,8 m/z; [M+H] = 700,8 m/z; [M+ACN+2H]/2 = 371,4 m/z

Fmoc-asaArg-Phe-NH₂ mass: [M] = 543,6 m/z; [M+H] = 544,6 m/z

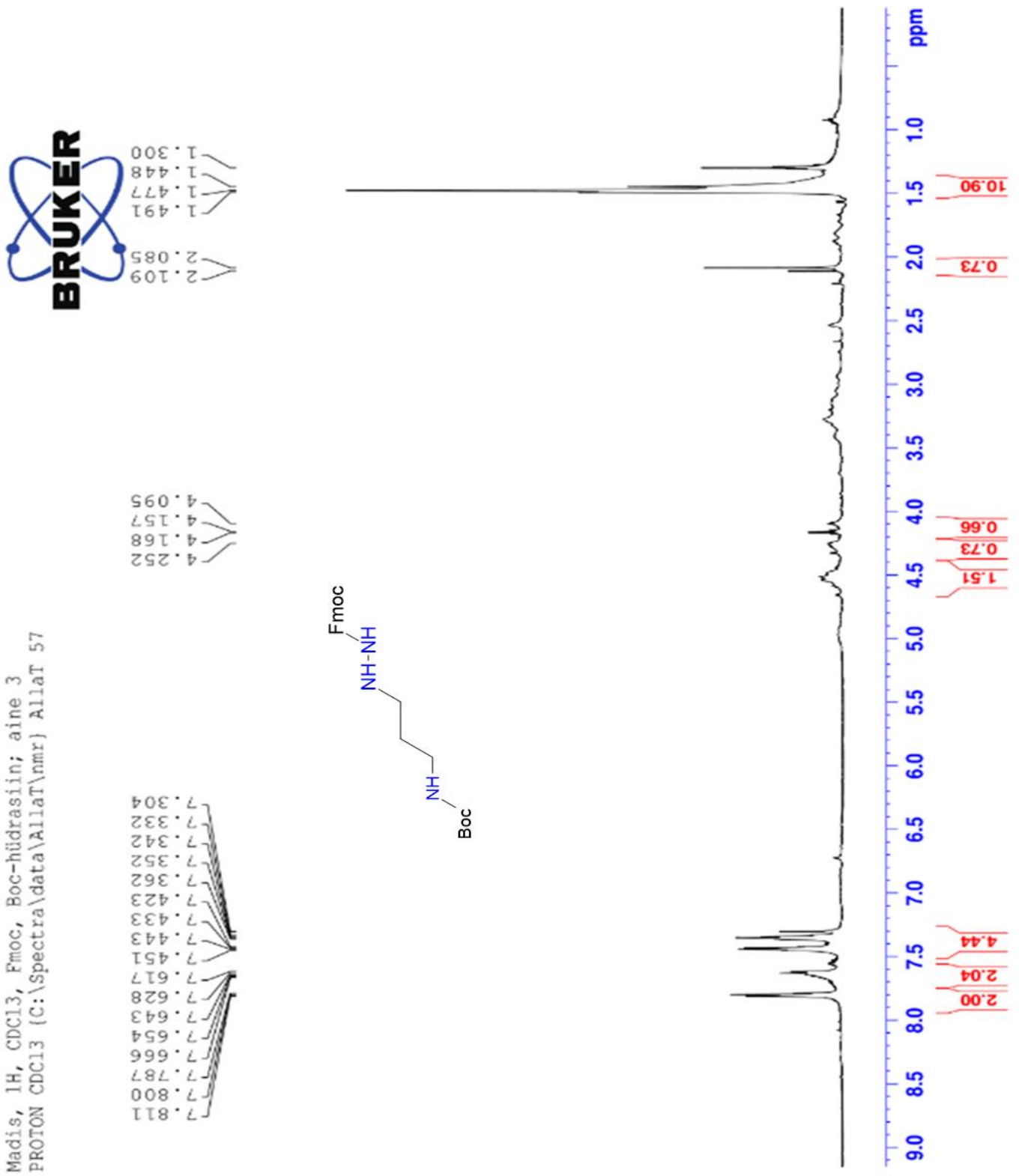
Reaktsioonisaagised arvatati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Reaktsioonisegu lahustati 20% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 20% B; 2 min – 20% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 20% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl.

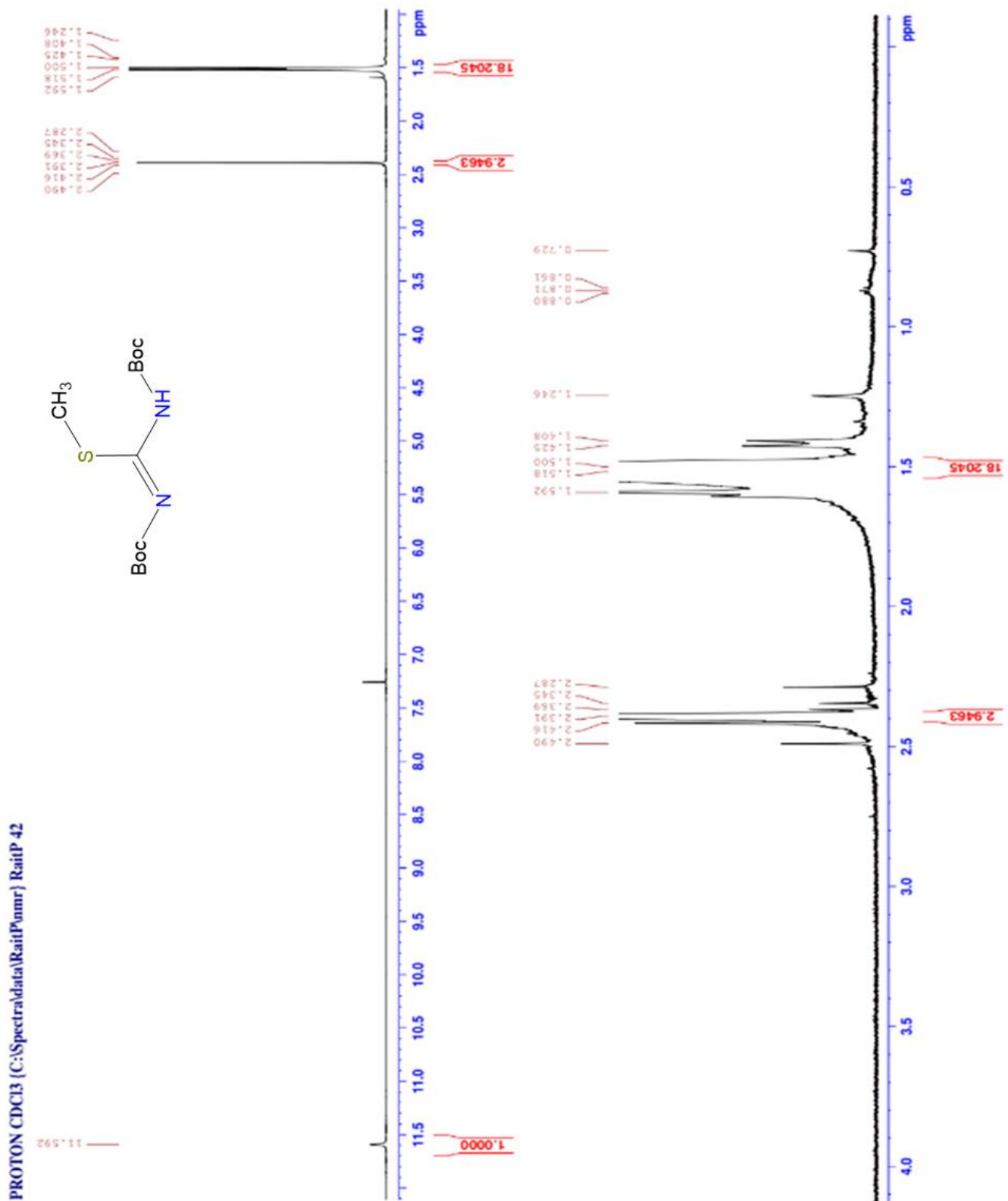
LISA 7 – N-Boc-3-bromopropüülamiini ¹H TMR spekter



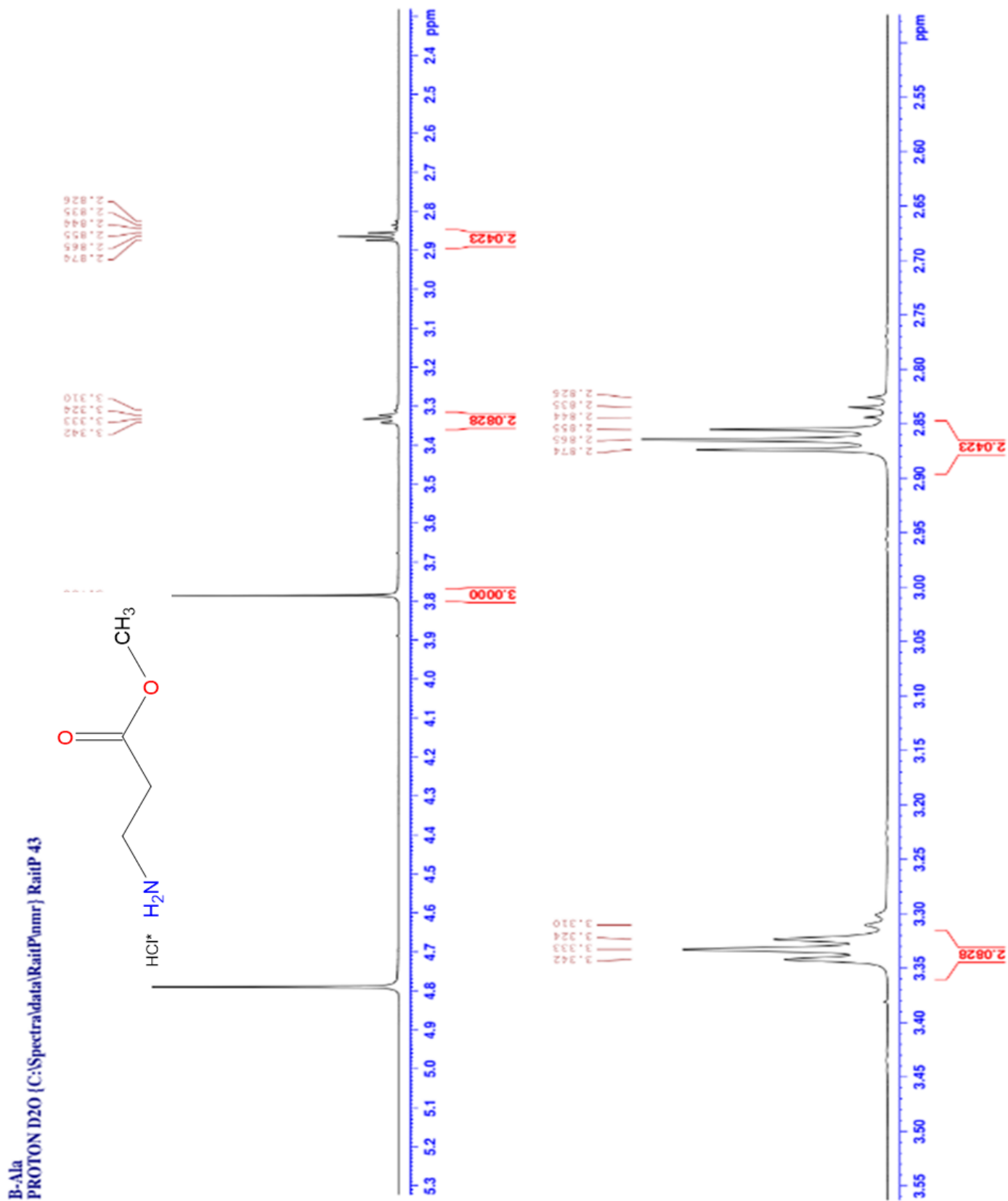
LISA 8 – N-Fmoc-N'-(3-N''-Boc-propüül)hüdrasiini ¹H TMR spekter



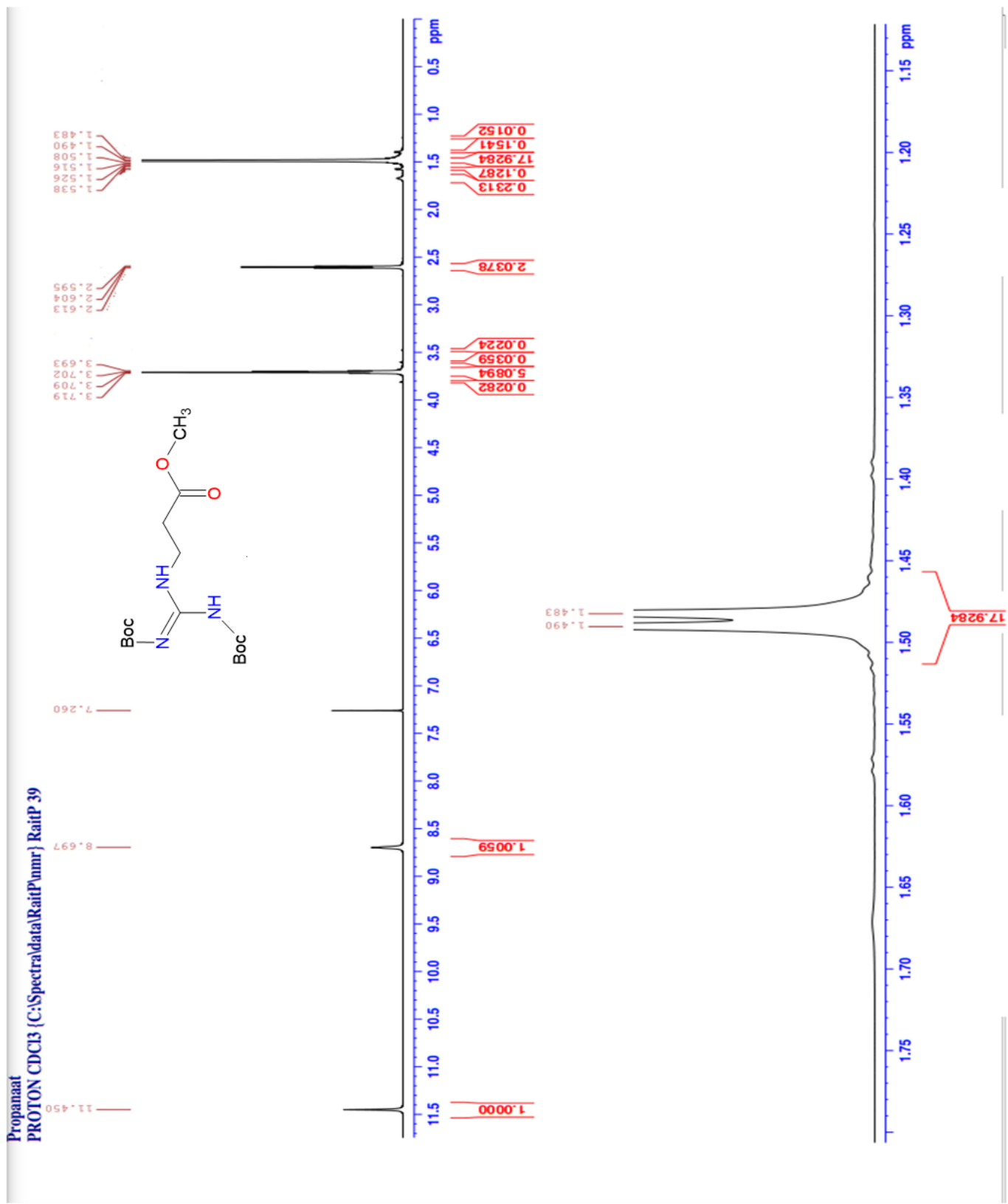
LISA 9 – *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiouurea ¹H TMR spekter



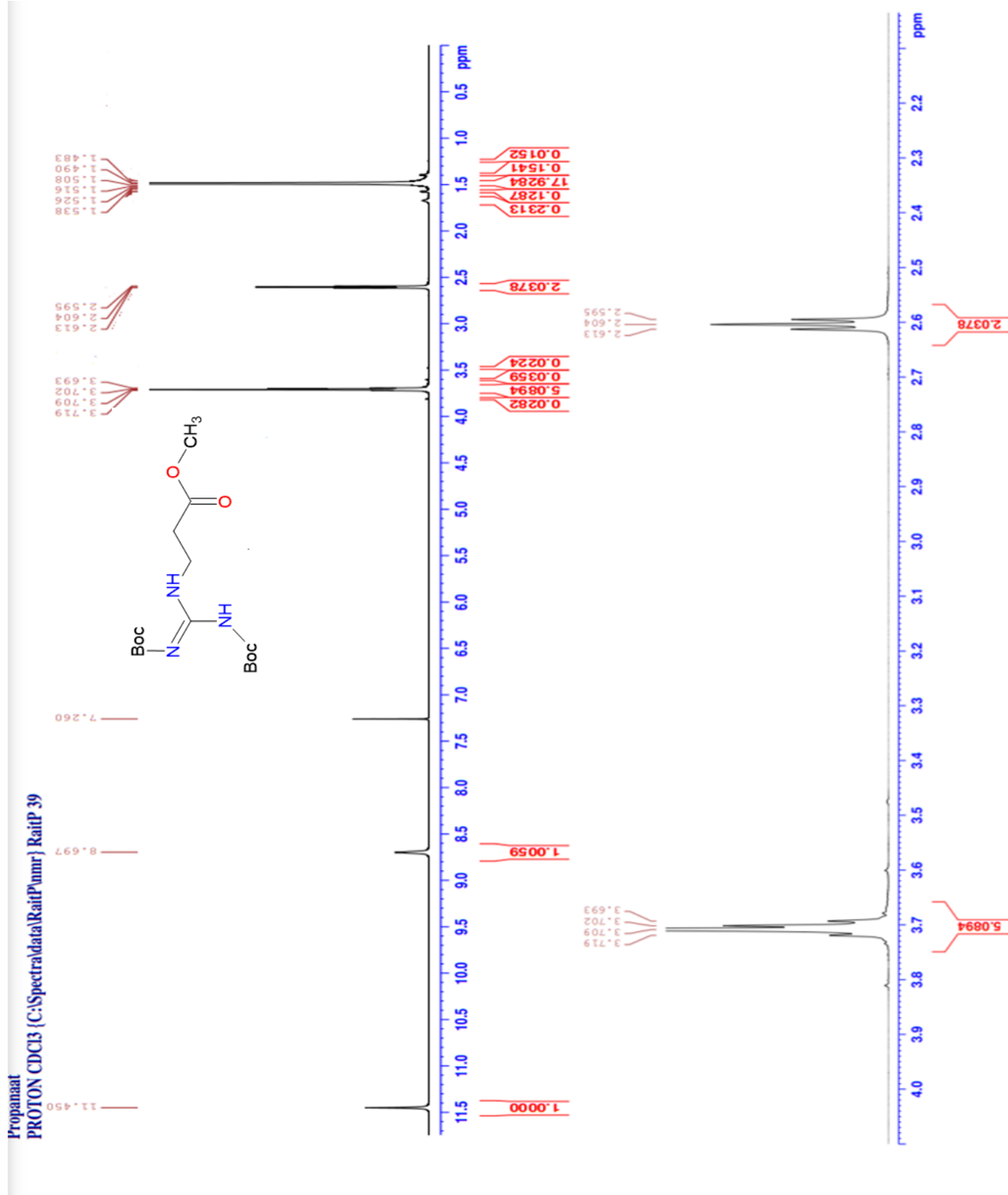
LISA 10 – β -alaniini metüülestri ^1H TMR spekter



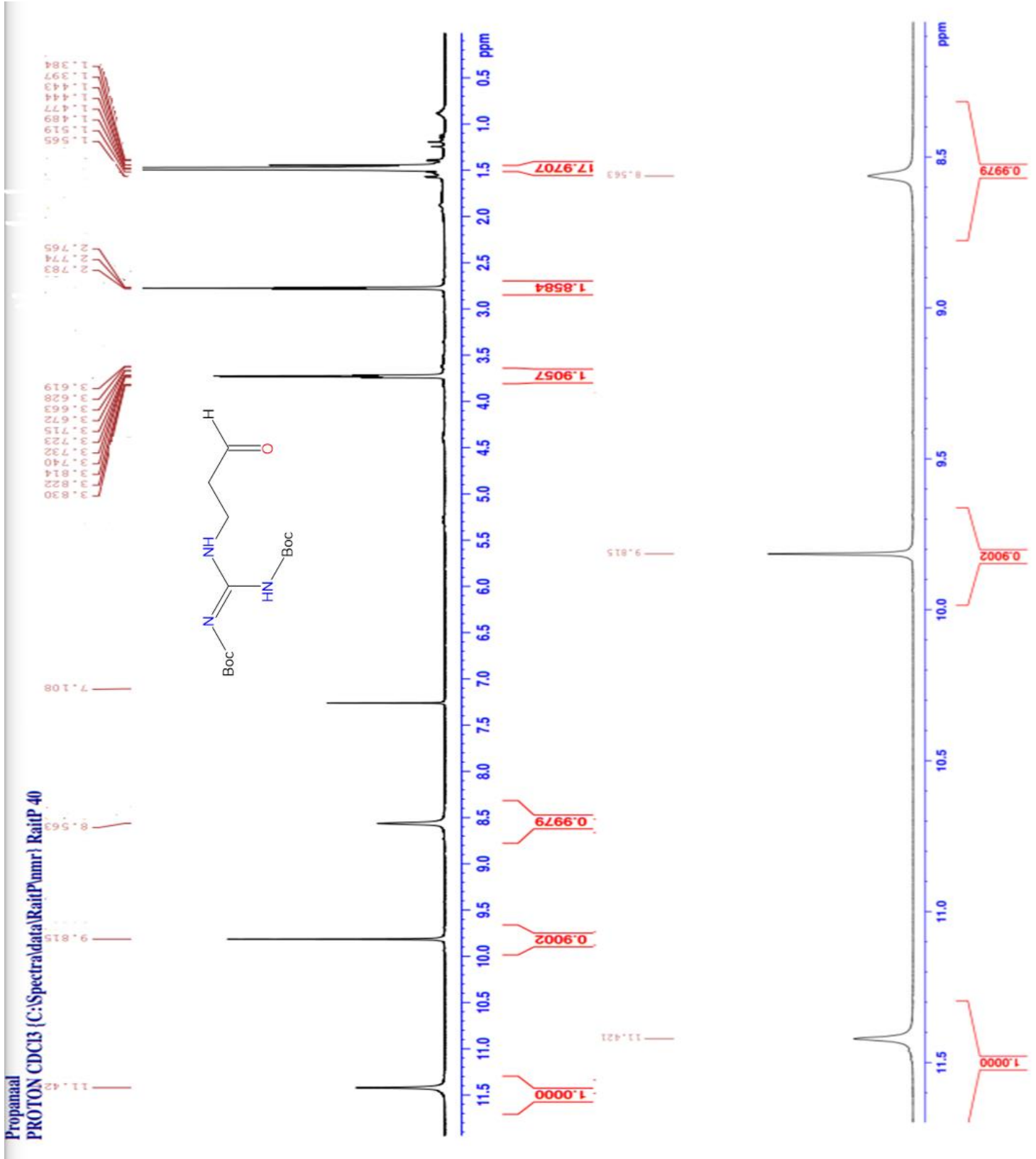
LISA 11 – Metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadi ¹H TMR spekter 1



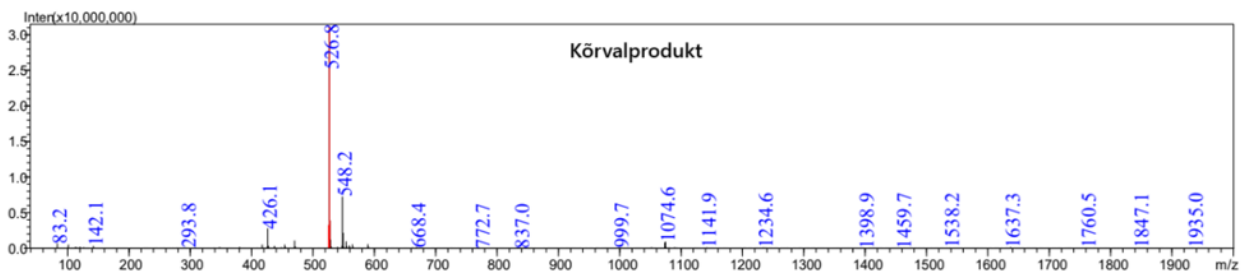
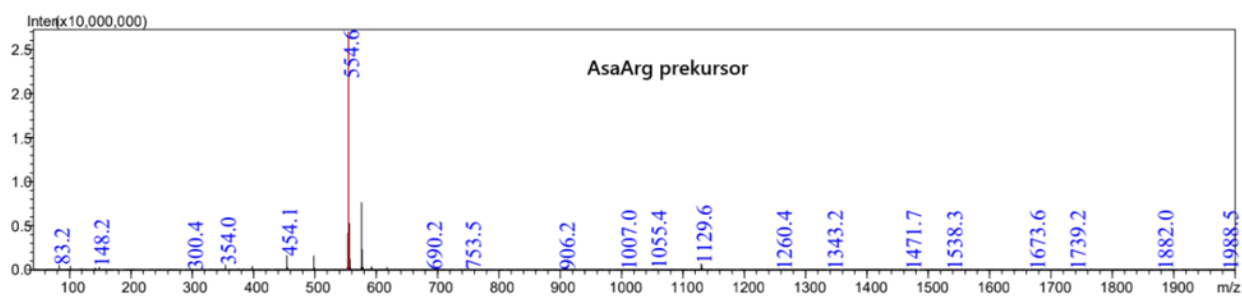
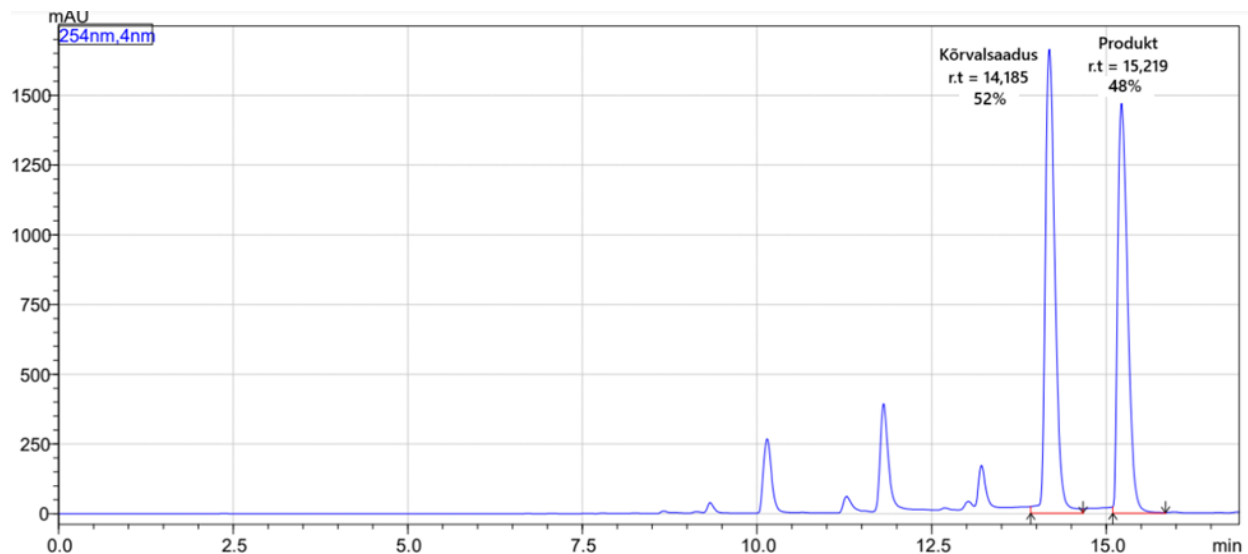
LISA 12 – Metüül-3-(*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadi ¹H TMR spekter 2



LISA 16 – Metüül-3-(N^{ω},N^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaali ^1H TMR spekter 3



LISA 17 – *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini toorprodukti kromatogramm ja massispekter



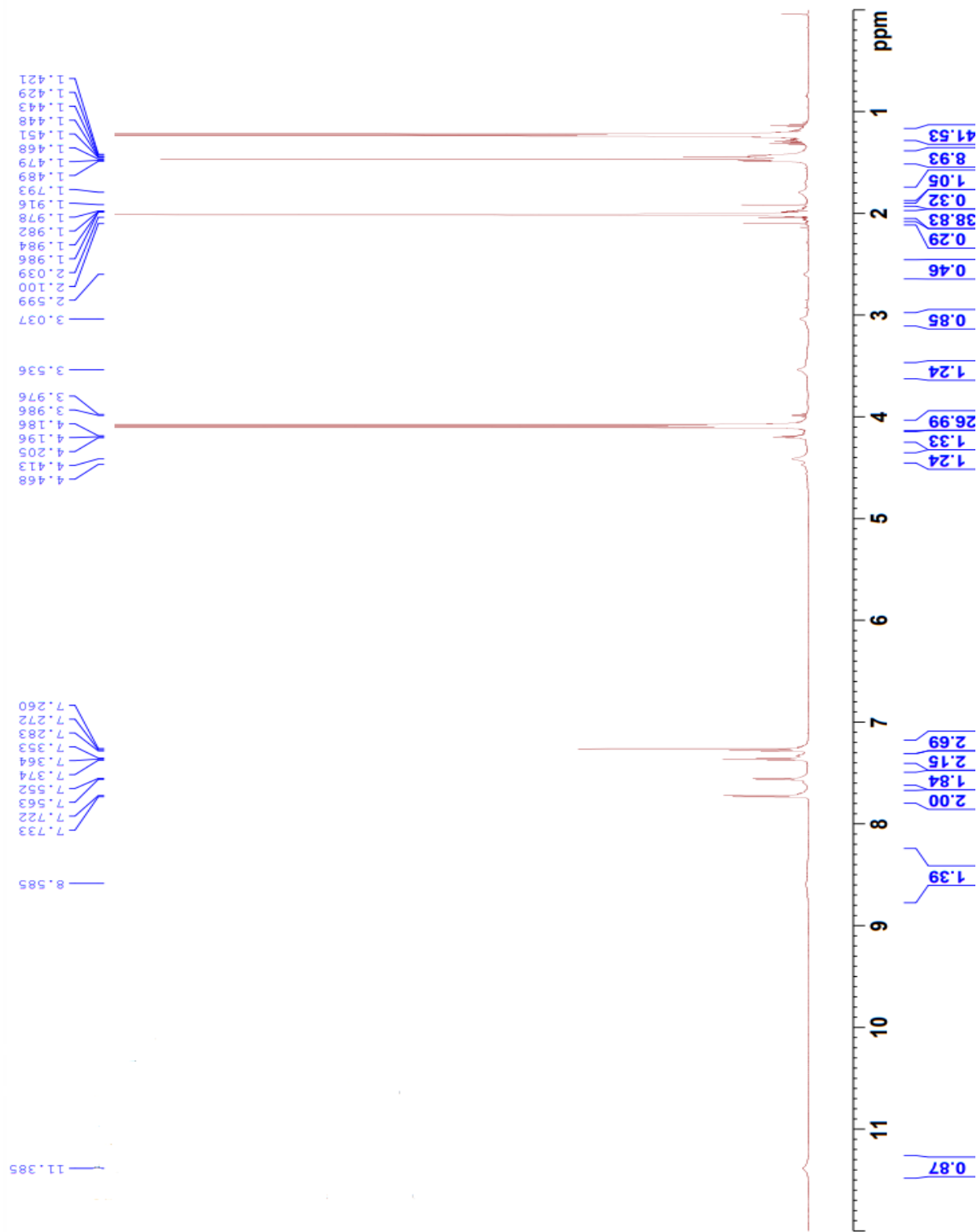
N-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini mass: [M] = 553,6 m/z;

[M+H] = 554,6 m/z; [M+Na] = 576,6 m/z

Kõrvalprodukti mass: [M] = 525,8 m/z; [M+H] = 526,8 m/z; [M+Na] = 548,2 m/z

Reaktsioonisegu lahustati 20% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 20% B; 2 min – 20% B; 19 min – 70% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 20% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

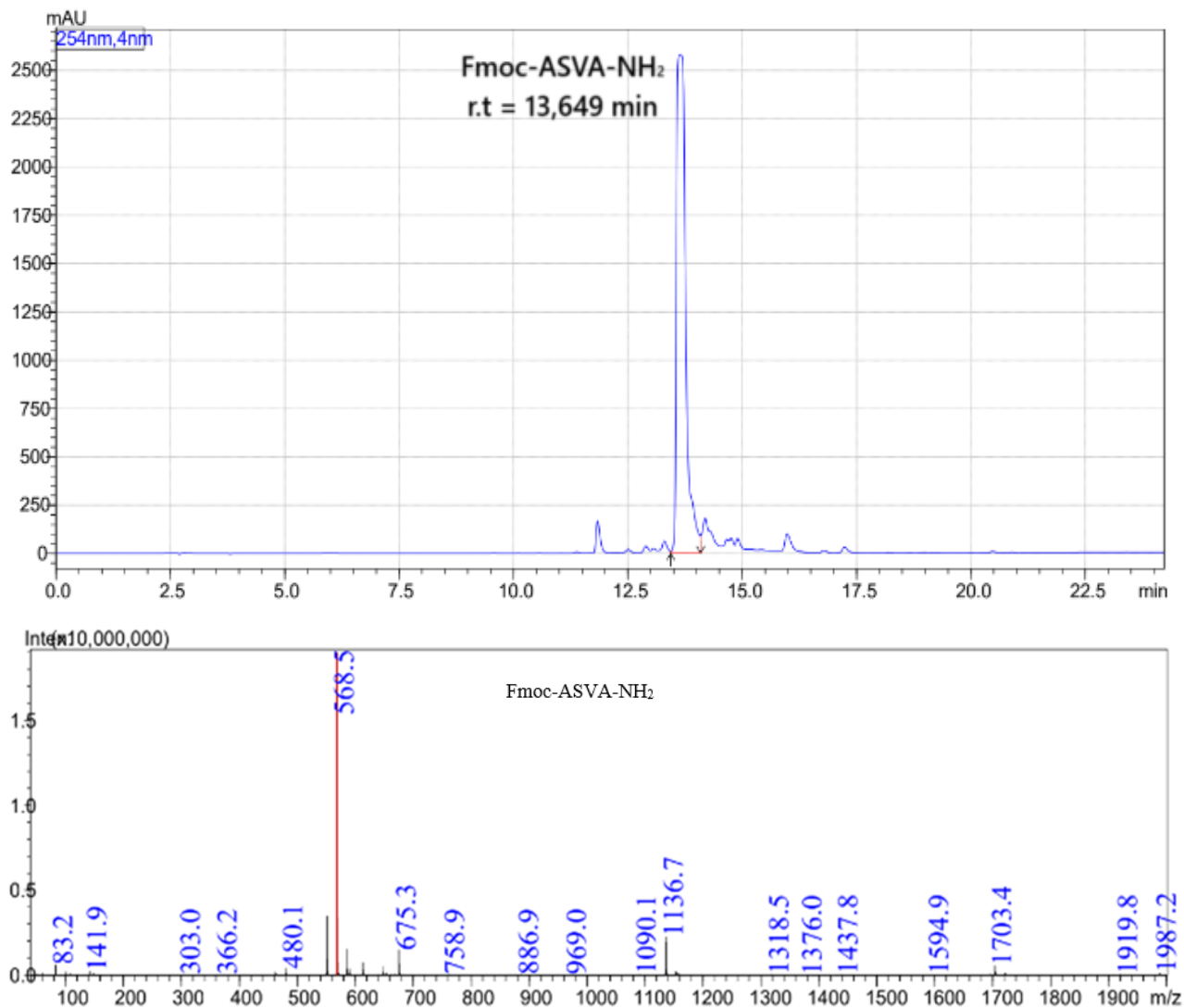
LISA 18 - *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini
 toorprodukti kõrvalsaaduse ¹H TMR spekter



LISA 19 - *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini
toorprodukti kõrvalsaaduse ¹³C TMR spkter



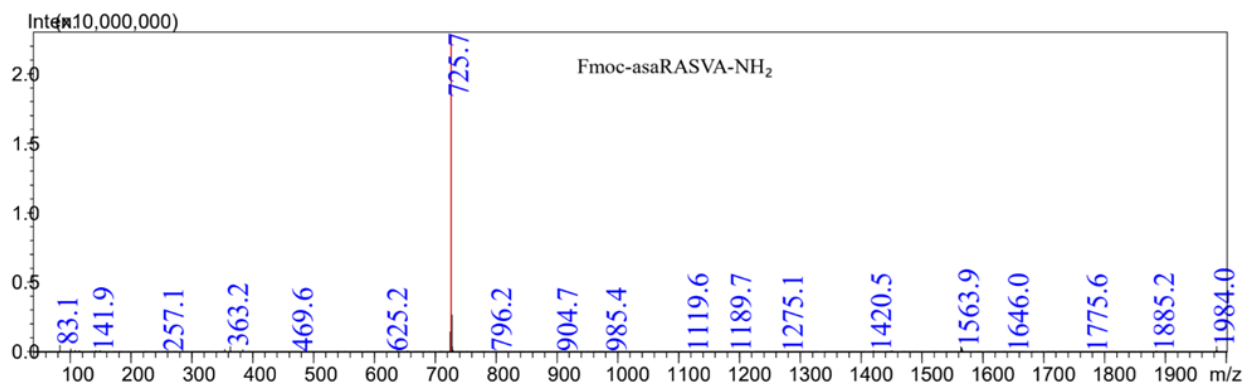
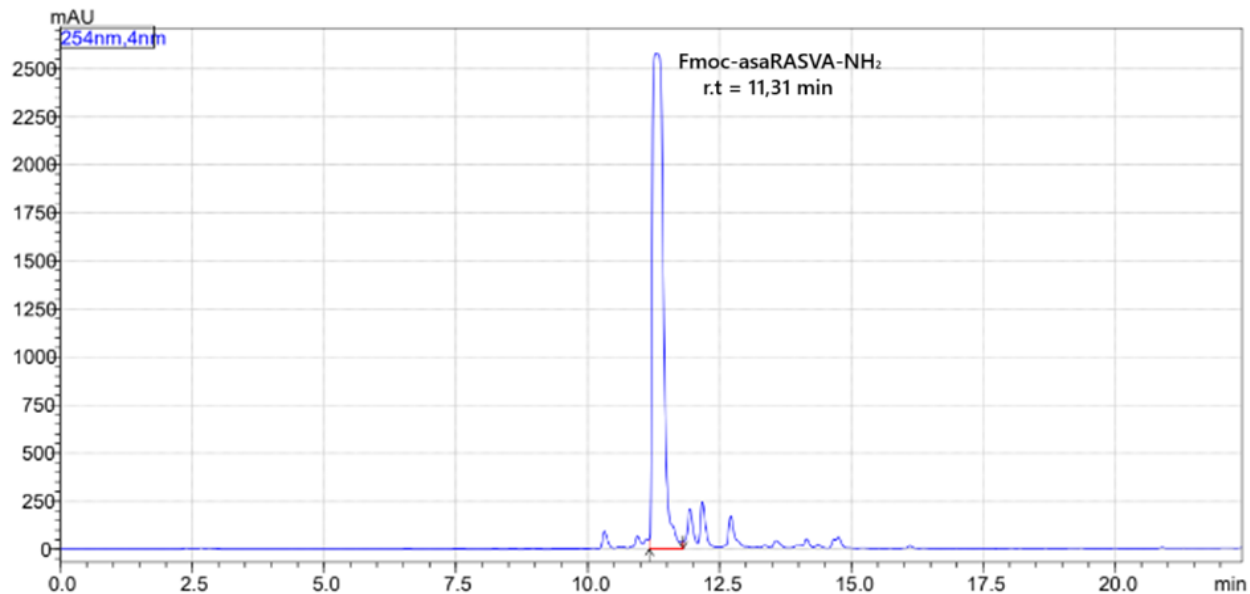
LISA 20 – Fmoc-ASVA-NH₂ kromatogramm ja massispekter



Fmoc-ASVA-NH₂ mass: [M] = 567,6 m/z; [M+H] = 568,5 m/z

Toorpeptiid lahustati 40% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 2 min – 5% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

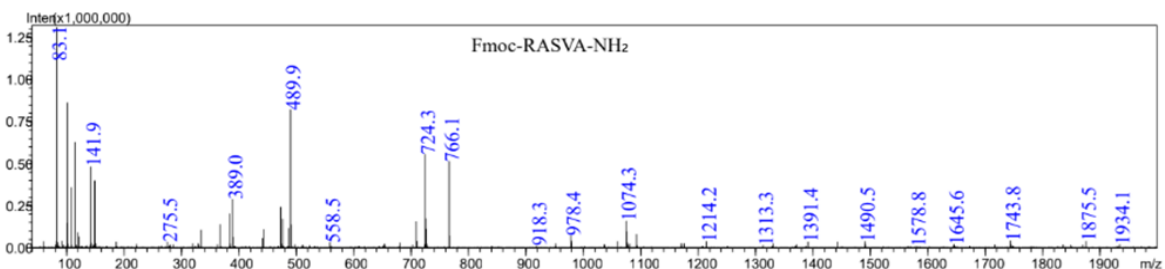
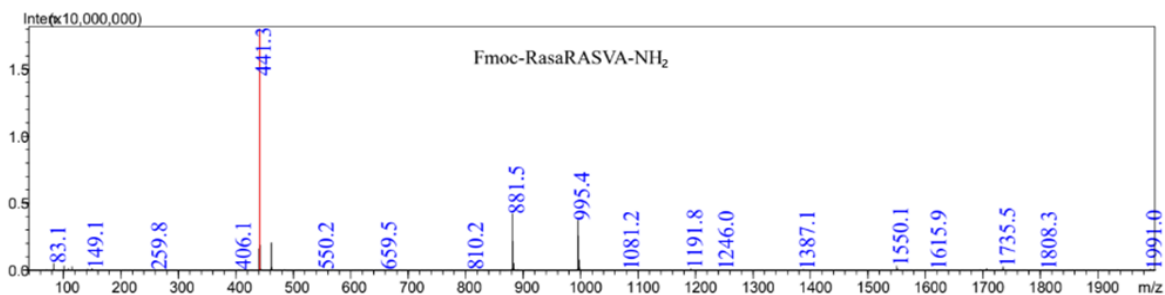
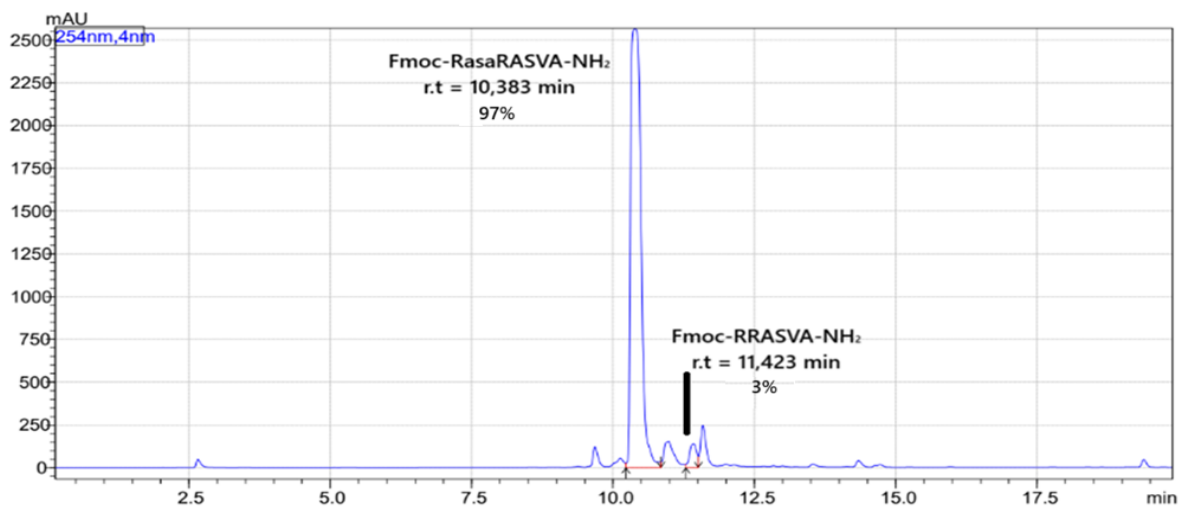
LISA 21 – Fmoc-asaRASVA-NH₂ kromatogramm ja massispekter



Fmoc-asaRASVA-NH₂ mass: [M] = 724,8 m/z; [M+H] = 725,8 m/z

Toorpeptiid lahustati 40% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 2 min – 5% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

LISA 22 – Fmoc-RasaRASVA-NH₂ kromatogramm ja massispekter (lähteaineid lisatud üks kord)



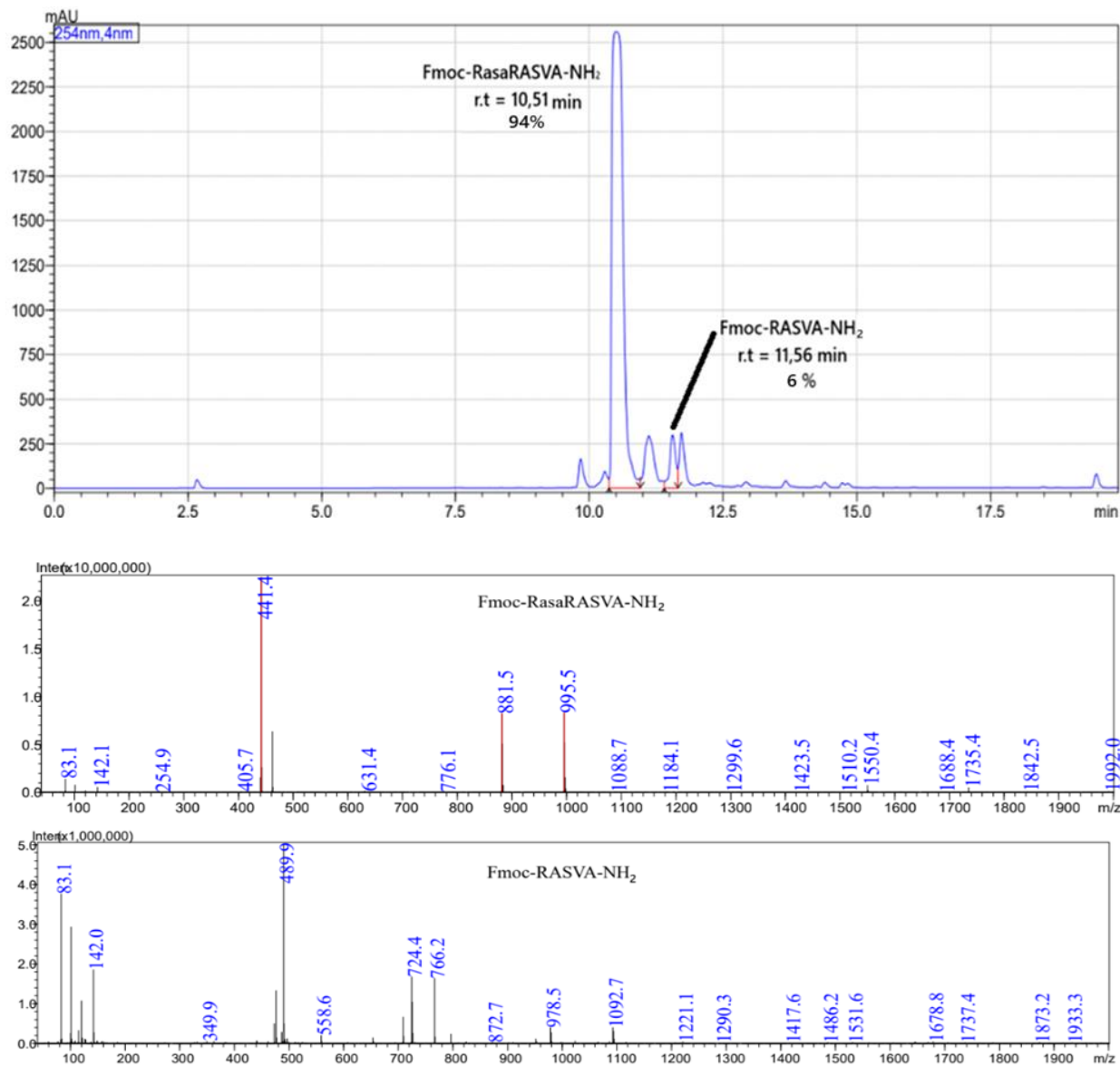
Fmoc-RasaRASVA-NH₂ mass: [M] = 881 m/z; [M+H] = 882 m/z; [M+H]/2 = 441,5 m/z;
[M+TFA+H] = 995,4 m/z

Fmoc-RASVA-NH₂ mass: [M] = 723,8 m/z; [M+H] = 724,8 m/z

Reaktsioonisaagised arvatati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Toorpeptiid lahustati 40% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 2 min – 5% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

LISA 23 – Fmoc-RasaRASVA-NH₂ kromatogramm ja massispekter (lähteaineid lisatud kaks korda)



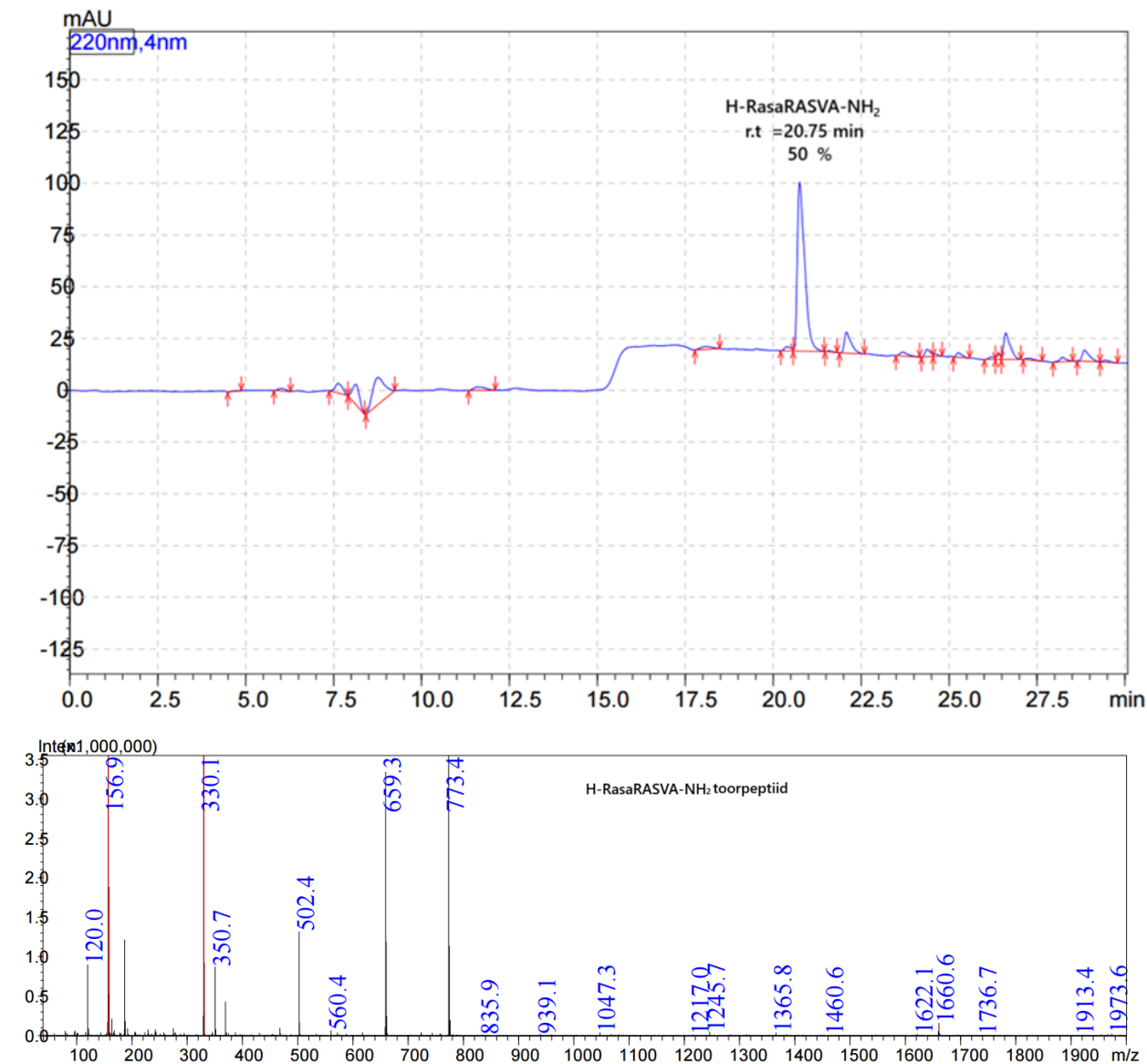
Fmoc-RasaRASVA-NH₂ mass: [M] = 881 m/z; [M+H] = 882 m/z; [M+H]/2 = 441 m/z

Fmoc-RASVA-NH₂ mass: [M] = 723,8 m/z; [M+H] = 724,8 m/z; [M+ACN+H] = 765,8 m/z

Reaktsioonisaagised arvutati produkti ja lähteaine piikide pindalade suhete abil.

Toorpeptiid lahustati 40% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 2 min – 5% B; 19 min – 80% B; 23 min – 95% B; 26 min – 95% B; 29 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

LISA 24 - H-RasaRASVA-NH₂ toorpeptiidi kromatogramm ja massispekter

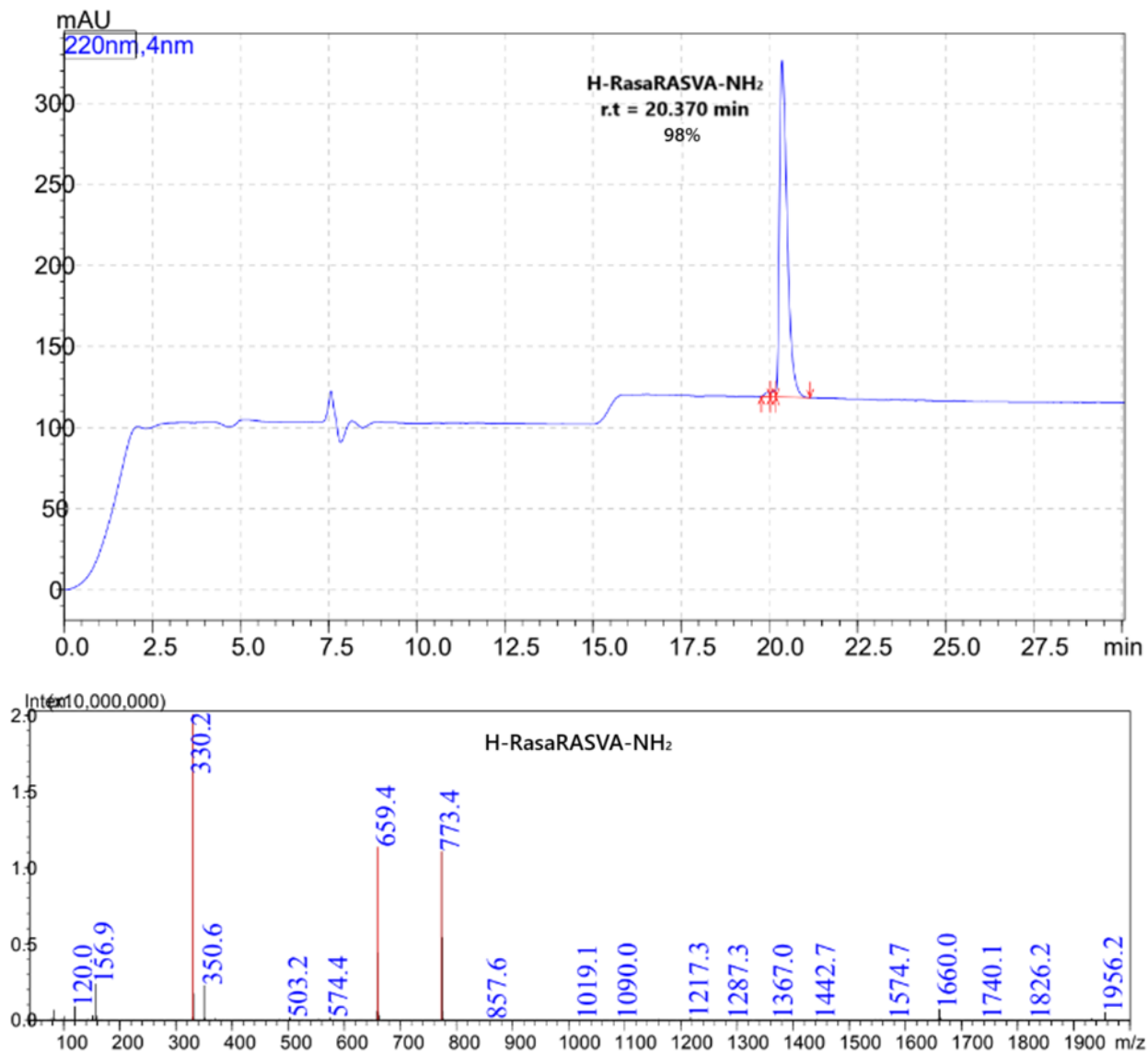


H-RasaRASVA-NH₂ mass: [M] = 658,7 m/z; [M+H] = 659,7 m/z; [M+ACN+2H] = 350,9 m/z
[M+2H] = 330,4 m/z

Puhtus arvutati produkti ja kõrvalsaaduste piikide pindalade suhete abil.

Toorpeptiid lahustati 5% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 7 min – 5% B; 25 min – 25% B; 30 min – 80% B; 33 min – 80% B; 35 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl.

LISA 25 - H-RasaRASVA-NH₂ puhastatud peptiidi kromatogramm ja massispekter



H-RasaRASVA-NH₂ mass: [M] = 658,7 m/z; [M+H] = 659,7 m/z; [M+ACN+2H] = 350,9 m/z
[M+2H] = 330,4 m/z

Puhtus arvutati produkti ja kõrvalsaaduste piikide pindalade suhete abil.

Toorpeptiid lahustati 5% ACN lahuses. HPLC analüüsi tingimused: 0 min – 5% B; 7 min – 5% B; 25 min – 25% B; 30 min – 80% B; 33 min – 80% B; 35 min – 5% B. Lahus A oli 0,1% TFA vesilahus ja lahus B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti voolukiirusega 1 ml/min. Süsti ruumala oli 20 – 40 µl

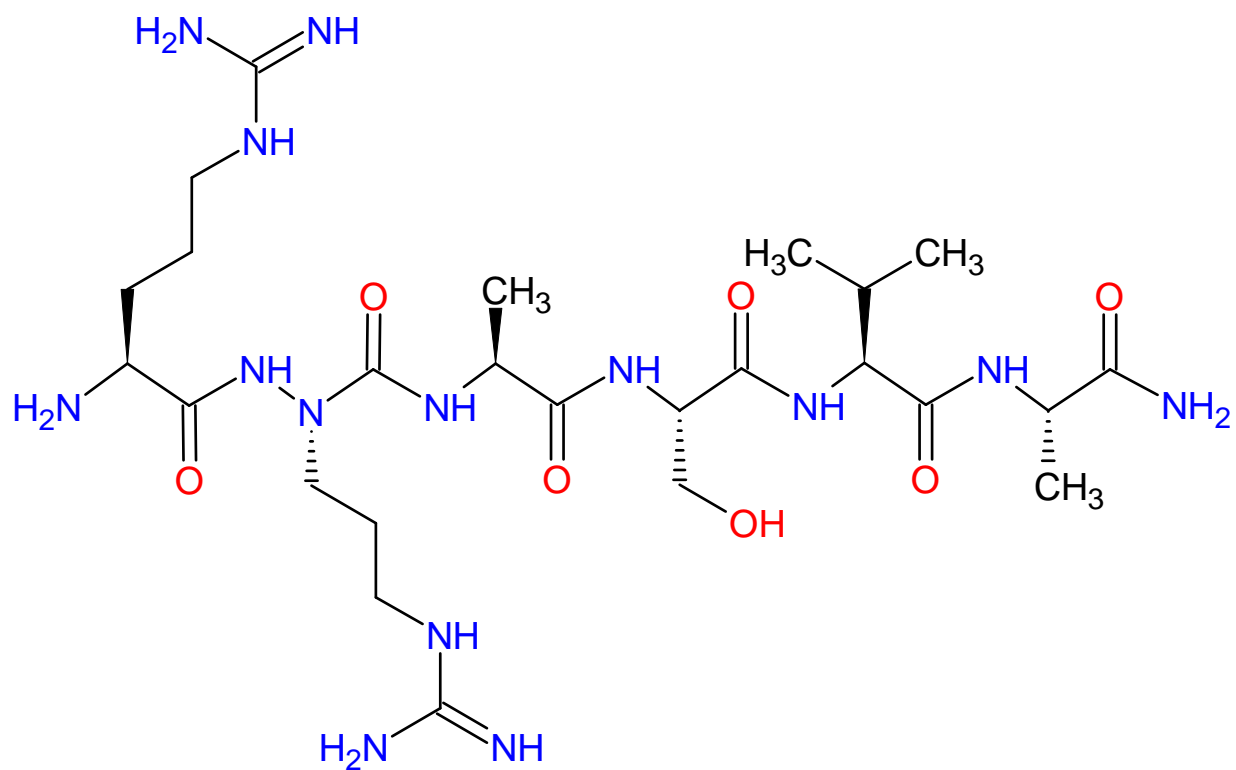
LISA 26 – H-RasaRASVA-NH₂ aminohapete sidumisreaktsiooni tingimused ja testide tulemused.

Nr	Lisatav AH	Aktivaator	Ekv	n (mmol)	Sidumine, KT	TLC test
1	Fmoc-L-Ala-OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	+
2	Fmoc-L-Val-OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	+
3	Fmoc-L-Ser-OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	+
4	Fmoc-L-Ala-OH -	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	+
5	Asa-Arg prekursor	BTC	4	0,68	24 h, kollane	+
6	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Ghosez reagent	3	0,51	20 h, -	-
7	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Ghosez reagent	3	0,51	20 h, -	+

LISA 27 – H-RasaRASVA-NH₂ massid ja saagised

H-RasaRASVA-NH₂ toorpeptiidi kaalutis	73 mg
H-RasaRASVA-NH₂ sisaldus enne HPLC-ga puhastamist (220 nm)	50%
H-RasaRASVA-NH₂ sisaldus peale HPLC-ga puhastamist (220 nm)	98%
H-RasaRASVA-NH₂ kaalutis peale HPLC-ga puhastamist	19 mg
H-RasaRASVA-NH₂ teoreetiline mass	120 mg
H-RasaRASVA-NH₂ saagis peale HPLC-ga puhastamist	16%

LISA 28 – Töö käigus sünteesitud asa-peptiid H-RasaRASVA-NH₂



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Madis Palmet,

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

Asa-Arginiini sisaldava asa-peptiidi süntees, mille juhendajad on Anu Ploom, Alla Troska-Palla ja Rait Palla,

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

1.1 Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1.2 Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Madis Palmet

Tartu 28.05.2024