

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Annika Prillop

Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga TCFH

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: Anu Ploom, PhD

Tartu 2025

INFOLEHT

Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga TCFH

Asa-peptiidid on peptiidianaloogid, milles vähemalt ühe aminohappe α -süsinik on asendatud lämmastikuga. Asa-peptiidide süntees on aga keeruline; peamiselt valmistab probleeme asa-aminohappe *N*-terminaalile järgmise aminohappe sidumine. Selle reaktsiooni efektiivsemaks läbiviimiseks SPPS-meetodit kasutades on vaja testida erinevaid aminohappe aktivaatoreid.

Selle töö eesmärgiks oli hinnata TCFH efektiivsust aminohappe aktivaatorina asa-peptiidsideme sünteesil mudelpeptiidides Ala-asaAla-Phe-NH₂ ja Tyr-asaAla-Phe-NH₂. TCFH-d testiti koos erinevate aluste ja lisandiga. Peamiseks probleemiks TCFH-d kasutades oli epimerisatsioon, mida oli küll võimalik lisandit kasutades alla suruda, kuid reaktsiooni saagised olid siiski madalad ja reaktsioon oli aeglane. Seega ei ole TCFH testitud mudelpeptiidides ja kasutatud reaktsioonitingimustel sobilik aktivaator asa-peptiidsideme sünteesimiseks.

Märksõnad: asa-peptiid, asa-peptiidsüntees, TCFH, NMI, Oxyma-B, kineetika, SPPS

Orgaaniline keemia – P390

Formation of aza-peptide bond with amino acid activator TCFH

Aza-peptides are peptidomimetics, in which the α -carbon of at least one amino acid has been replaced with nitrogen. The synthesis of aza-peptides is complicated; the most problematic step is coupling the next amino acid to the *N*-terminus of the aza-amino acid. To make this step more effective when using the SPPS method, various coupling reagents need to be tested.

The aim of this research was to determine the effectiveness of TCFH as a coupling reagent for aza-peptide bond synthesis in the model peptides Ala-azaAla-Phe-NH₂ and Tyr-azaAla-Phe-NH₂. TCFH was tested with different bases as well as an additive. The main problem when using TCFH was epimerization. Though epimerization could be suppressed with the additive, the reaction yields were low and the reaction was slow. Thus, TCFH is not a suitable coupling reagent for these model peptides and using the tested reaction conditions.

Keywords: aza-peptide, aza-peptide synthesis, TCFH, NMI, Oxyma-B, kinetics, SPPS

Organic chemistry – P390

Sisukord

INFOLEHT	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Asa-peptiidid	8
1.2. Peptiidisüntees.....	8
1.3. Asa-peptiidide süntees SPPS meetodil.....	11
1.4. Aminohappe aktivaator TCFH	13
2. Eksperimentaalne osa	14
2.1. Kasutatud reaktiivid	14
2.2. Aparatuur.....	15
2.3. Fmoc-asaAla-Phe-vaik süntees	16
2.3.1. Fenüülalaniini sidumine tahkele kandjale	16
2.3.2. Kaiseri test.....	16
2.3.3. Asa-alaniini sidumine fenüülalaniinile.....	17
2.4. Ala-asaAla-Phe-vaik ja Tyr-asaAla-Phe-vaik süntees	17
2.5. Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt	19
2.6. Ala-asaAla-Phe-vaik ja Tyr-asaAla-Phe-vaik süntees koos lisandiga Oxyma-B	19
3. Tulemused ja arutelu	21
3.1. Aktivaator TCFH alusega DIPEA mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH ₂ sünteesil.....	22
3.2. TCFH alusega NMI mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH ₂ sünteesil	24
3.3. TCFH alusega NMI ja lisandiga Oxyma-B mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH ₂ sünteesil.....	25
3.4. TCFH alusega NMI mudelpeptiidi Tyr-asaAla-Phe-NH ₂ sünteesil	27
Kokkuvõte	30
Summary	31
Kasutatud kirjandus.....	32
Lisad	34

Kasutatud lühendid

Lühend	Ingliskeelne vaste	Eestikeelne vaste
Ala	<i>Alanine</i>	Alaniin
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitriil
Boc	<i>Tert-butyloxycarbonyl</i>	<i>Tert</i> -butoksükarbonüül
BTC	<i>Bis(trichloromethyl)carbonate</i>	Bis(triklorometüül)karbonaat/trifosgeen
COMU	<i>1-((1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)-dimethylamino-morpholinomethylene))methanaminium hexafluorophosphate</i>	1-((1-(Tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülideenaminooksü)-dimetüülamino-morfolinometüleen))metaanamiinium heksafluorofosfaat
DCM	<i>Dichloromethane</i>	Diklorometaan
DIPEA	<i>N,N-Diisopropylethylamine</i>	<i>N,N</i> -Diisopropüületüülamiin
DMF	<i>N,N-Dimethylformamide</i>	<i>N,N</i> -Dimetüülformamiid
Fmoc	<i>9-Fluorenylmethyloxycarbonyl</i>	9-Fluorenüülmetoksüülkarbonüül
HATU	<i>O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate</i>	<i>O</i> -(7-Asabensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HBTU	<i>2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>	2-(1H-Bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HCTU	<i>O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>	<i>O</i> -(6-Klorobensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HDMC	<i>[(5-chloro-3-oxidobenzotriazol-3-ium-1-yl)-morpholin-4-ylmethylidene]-dimethylazanium hexafluorophosphate</i>	[(5-Kloro-3-oksidobensotriasool-3-ium-1-üül)-morfoliin-4-üülmetüüldieen]-dimetüülasaanium heksafluorofosfaat

HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
HOAt	<i>1-Hydroxy-7-azabenzotriazole</i>	1-Hüdroksü-7-asabensotriasool
HOBt	<i>1-Hydroxybenzotriazole</i>	1-Hüdroksübensotriasool
k _{obs}	<i>Observed rate constant</i>	Näiline kiiruskonstant
LPPS	<i>Liquid-phase peptide synthesis</i>	Vedelfaasiline peptiidisüntees
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Massispektromeetria
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>	Massi-laengu suhe
NMI	<i>N-Methylimidazole</i>	N-Metüülimidasool
Oksüma	<i>Ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate</i>	Etüül-2-tsüano-2-(hüdroksüimino)atsetaat
Oxyma-B	<i>5-(Hydroxyimino)-1,3-dimethyl-1,3-diazinane-2,4,6-trione</i>	5-(Hüdroksüimino)-1,3-dimetüül-1,3-diasinaan-2,4,6-trioon
Phe	<i>Phenylalanine</i>	Fenüülalaniin
PyBOP	<i>(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate</i>	Bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidino-fosfoonium heksafluorofosfaat
PyOxim	<i>O-((Cyano(ethoxycarbonyl)methyliden)-amino)-yloxytri(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate</i>	O-((Tsüano(etoksükarbonüül)metüülideen)-amino)-üüloksütri(pürrolidino)fosfoonium heksafluorofosfaat
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i>	Tahkefaasiline peptiidisüntees
TBTU	<i>O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate</i>	O-(Bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat
TCFH	<i>N,N,N',N'-Tetramethylchloroformamidinium hexafluorophosphate</i>	N,N,N',N'-Tetrametüülkloroformamidiinium-heksafluorofosfaat

TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>	Trifluoroetaanhape
TIS	<i>Triisopropylsilane</i>	Triisopropüülsilaan
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>	Õhukese kihi kromatograafia
Tyr	<i>Tyrosine</i>	Türosiin
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>	Ultravioletne-nähtav

Sissejuhatus

Asa-peptiidid on peptiidianaloogid, milles vähemalt ühe aminohappejäägi α -süsinik on asendatud lämmastikuga. Asa-peptiidid on sageli elusorganismis pikema elueaga [1] ning võivad olla paremate bioaktiivsete omadustega (näiteks selektiivsus) kui tavapeptiidid. Seetõttu on asa-peptiidid paljutöötavad ravimikandidaadid. [2,3]

Siiski on asa-peptiide pigem vähe uuritud, kuna asa-aminohapete prekursorite sünteesimine on keeruline ja asa-aminohappele järgmise aminohappe liitmiseks pole rahuldavaid sünteesimeetodeid. Erinevalt tavalise peptiidsideme moodustumisest sõltub asa-peptiidsideme moodustumise kiirus ja saagis tugevalt aminohappe aktivaatori valikust. Asa-peptiidsideme moodustumine on ka oluliselt aeglasem. [4,5] Lisaks sõltub asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni kiirus ka asa-aminohappe ja sellele seotava aminohappe kõrvalahelate sterilisest takistusest ja reaktsiooni saagis on sageli üsna madal [4,6,7].

Selles töös uuritakse asa-peptiidsideme moodustumist, kasutades aminohappe aktivaatorina TCFH-d (*N,N,N',N'*-tetrametüülkloroformamidiinium-heksafluorofosfaat). On leitud, et koos *N*-metüülimidasooliga (NMI) on TCFH väga efektiivne aktivaator raskesti sünteesitavate amiidsidemete sünteesimiseks [8]. Kasutades TCFH-d koos alusega NMI asa-peptiidsideme sünteesiks, on aga probleemiks ahelale lisatava aminohappe α -süsiniku epimerisatsioon ehk osa aminohappest liitub ahelale L-konfiguratsioonis, osa D-konfiguratsioonis [9].

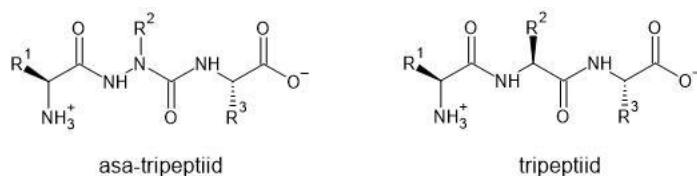
Selles töös testitakse TCFH-d koos alustega DIPEA (*N,N*-diisopropüületüülamiin) ja NMI ning lisandiga Oxyma-B (5-(hüdrosüimino)-1,3-dimetüül-1,3-diasinaan-2,4,6-trioon). Aktivaatori TCFH testimine toimub koostöös ettevõttega Luxembourg Bio Technologies. Asa-peptiidsideme moodustumist uuritakse mudelpeptiidides Ala-asaAla-Phe-NH₂ ja Tyr-asaAla-Phe-NH₂. Asa-peptiid sünteesitakse selles töös tahkefaasilise peptiidsünteesi (SPPS) meetodiga ja asa-peptiidsideme moodustumist jälgitakse vedelikkromatograafia-massispektromeetria (HPLC-MS) abil.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Asa-peptiidid

Peptiidid on paljutõotavad ravimikandidaadid, kuna need võivad olla väga spetsiifilised ning kõrge afiinsusega. Peptiidide peamisteks puudusteks ravimikandidaadidena on aga nende lühike eluiga organismis ja madal biosaadavus. [10] Peptiidide omaduste parandamiseks uuritakse peptidomimeetikuid ehk peptiide, mille struktuuri on keemiliselt modifitseeritud [11].

Üks võimalik modifikatsioon on peptiidi põhiahelas vähemalt ühe aminohapejäägi α -süsiniku asendamine lämmastikuga (Joonis 1). Selliselt modifitseeritud peptiide nimetatakse asa-peptiidideks ja modifitseeritud aminohapet asa-aminohappeks. Erinevalt tavalisest aminohapest ei sisalda asa-aminohape kiraalset tsentrit. Samuti on asa-aminohappe struktuur jäigem [12,13]. Seetõttu mõjutab aminohapejäägi asendamine asa-aminohappega väga tugevalt peptiidide sekundaarstruktuuri, mis võib parandada asa-peptiidide bioaktiivseid omadusi, näiteks afiinsust ja selektiivsust, võrreldes tavapeptiididega [9,12]. Asa-peptiidid on ka vastupidavamad proteaasidele, mistõttu on nad organismis pikema elueaga kui tavapeptiidid [1].



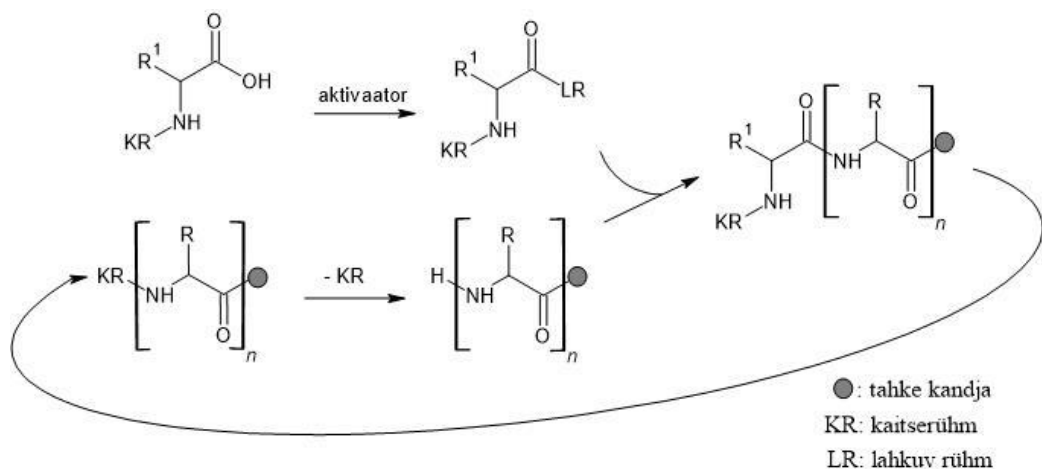
Joonis 1. Asa-peptiidi ja tavapeptiidi struktuuri võrdlus

Praegu on Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviameti (FDA) müügiloaga kaks asa-peptiidset ravimit: Goserelin [14], mida kasutatakse vähiravis, ja Atazanavir [15], mida kasutatakse HIV-nakkuse raviks.

1.2. Peptiidisüntees

Levinuim meetod peptiidide orgaanilises sünteesis on tahkefaasiline peptiidisüntees ehk SPPS (Joonis 2). SPPS-meetodis seotakse esimene aminohape C-terminaalset otsa pidi tahke kandjaga. Tahke kandja on reaktsioonikeskkonnas lahustumatu polümeer. Seejärel lisatakse tahke kandjaga seotud peptiidile ükshaaval järgmised aminohapped. Selle meetodi eeliseks on

peptiidi puhastamise lihtsus sünteesi vaheetappides: üleliigsed reagentid ja tahke kandjaga mitte-seotud kõrvalproduktid on võimalik kergesti välja filtreerida. [16]



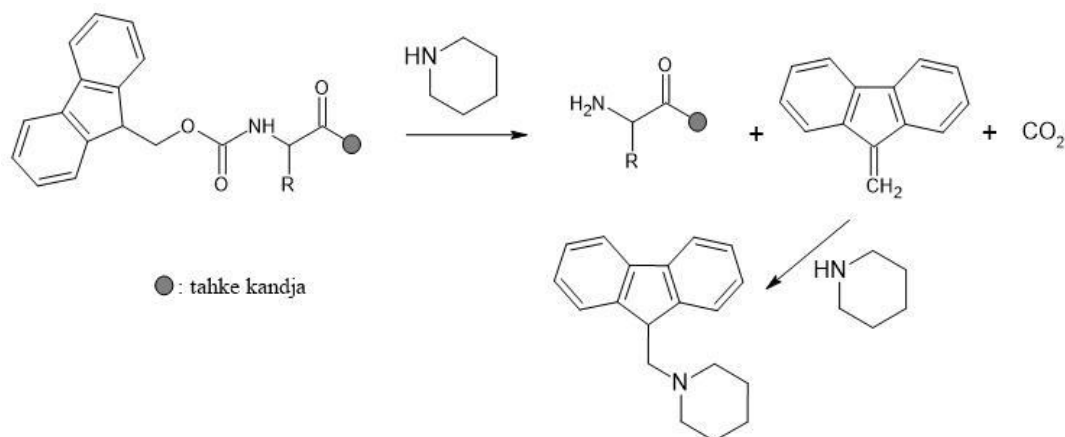
Joonis 2. Tahkefaasiline peptiidsüntees. R ja R¹ tähistavad aminohapete kõrvalahelaid.

SPPS-meetodi peamiseks puudusteks on kasutatavate reagentide ja solventide suured kogused (reaktsioone viiakse saagise parandamiseks läbi reagentide mitmekordses liias) ning kõrvalproduktide koguse kiire kasv koos sünteesitava ahela pikkusega [16]. Samuti ei peeta kasutatavaid solvente keskkonnasõbralikeks [17].

Peptiidsünteesis on reaktsioonide selektiivsuse saavutamiseks oluline roll kaitserühmadel. SPPS-meetodis on kõikide sünteesis kasutatavate aminohapete aminorühm seotud ajutise kaitserühmaga, et vältida ahelasse lisatava aminohappe molekulide omavahelist reagerimist. Osade aminohapete puhul peab olema kaitserühmaga seotud ka aminohappe kõrvalahel. [18] Enne järgmise aminohappe lisamist peptiidiahelasse eemaldatakse *N*-terminaali kaitserühm olemasolevalt peptiidilt [16].

Tahkefaasilises peptiidsünteesis praegu enimkasutatav *N*-terminaalne ajutine kaitserühm on 9- fluorenüülmetoksüülkarbonüülrühm (Fmoc-rühm) [19]. Varem kasutati ajutise kaitserühmana peamiselt tert-butoksüülkarbonüülrühma (Boc-rühm). Boc-rühma eemaldamiseks kasutatakse happelist keskkonda, mistõttu peavad ortogonaalsuse saavutamiseks kõrvalahelate kaitserühmad ja tahke kandja olema hapetele palju vastupidavamad. Selliste kaitserühmade eemaldamiseks on sageli vaja üsna ekstreemseid tingimusi, mis võivad viia kõrvalreaktsioonideni või peptiidiahelat kahjustada. Fmoc-rühma eemaldamiseks kasutatakse seevastu nõrku aluseid (enamasti piperidiin, Joonis 3), mis võimaldab lihtsamini saavutada kaitserühmade ortogonaalsust, isegi kasutades kõikide kaitserühmade eemaldamiseks võrdlemisi pehmeid tingimusi. Fmoc-kaitserühma

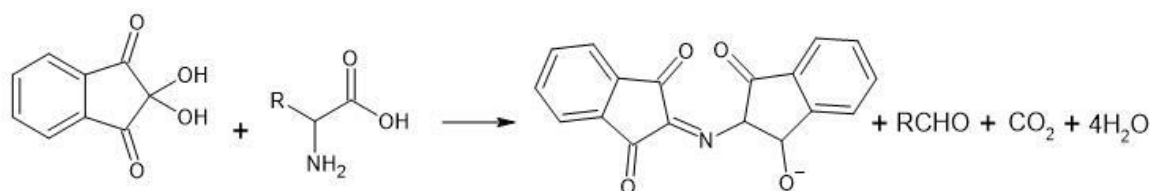
eemaldamisel tekib UV-aktiivne ühend, seega on võimalik kaitserühma eemaldumist kontrollida TLC (õhukese kihi kromatograafia) plaadi abil lahuse UV-aktiivsust kontrollides. Boc-rühm on aga endiselt oluline kaitserühm näiteks kõrvalahelate kaitsmiseks. [18, 20]



Joonis 3. Fmoc-kaitserühma eemaldamine piperidiiniga. R tähistab aminohappe kõrvalahelat.

Kuna peptiidside toatemperatuuril iseeneslikult ei teki, vaid moodustub ammooniumsool, kasutatakse peptiidisünteesis aktivaatoreid. Aktivaatorid asendavad peptiidahelasse lisatava aminohappe karboksüülse OH-rühma parema lahkuva rühmaga [19]. Aminohappe karboksüülrühma võib muuta näiteks atsüülhaliidiks, atsüülasiidiks, atsüülimidiasooliks, anhütriidiks või estriks, mis tahkefaasilises peptiidisünteesis reageerib edasi peptiidiahela *N*-terminaaliga. Erinevaid aktivaatoreid on väga palju, kuid üldiseks ohuks aktivaatorite kasutamisel on epimerisatsioon ning erinevad kõrvalreaktsioonid. Nende probleemide vältimiseks saab kasutada erinevaid lisandeid. [21]

Kontrollimaks, kas peptiidside on moodustunud, kasutatakse sageli ninhüdrin- ehk Kaiseritesti (Joonis 4). Ninhüdrin reageerib kõrgel temperatuuril peptiidiahela *N*-terminaalse otsa vaba aminorühmaga, moodustades tumesinise ühendi. Kui vabasid aminorühmasid ei ole, siis reaktsiooni ei toimu ja lahus jääb kollakaks. Vabade aminorühmade puudumisest saab järeldada, et aminohappe sidumine peptiidiahelale on olnud edukas. [22] Seda testi kasutatakse sageli ka *N*-terminaalse ajutise kaitserühma eemaldamise edukuse kontrollimiseks.

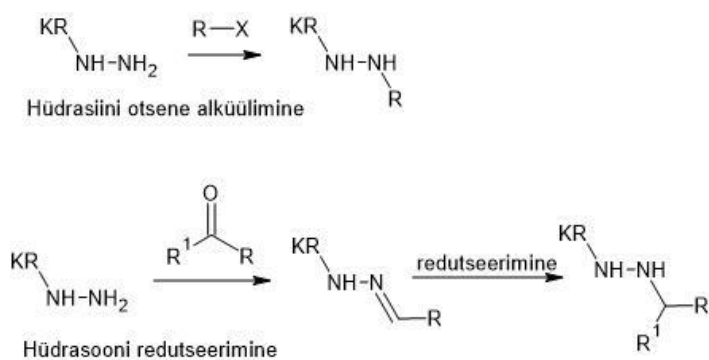


Joonis 4. Ninhüdrini reageerimine aminohappe vaba aminorühmaga

Peptiidide sünteesimiseks kasutatakse ka vedelfaasilist peptiidisünteesi (LPPS). Esimese aminohappe C-terminaal seotakse lahustuva polümeeriga. Seejärel lisatakse selle aminohappe N-terminaalile ükshaaval järgmised aminohapped sarnaselt SPPS-meetodiga. Peptiidi puhastamiseks kasutatakse ultrafiltratsiooni või polümeeri kristalliseerimist [23], mis on keerulisem, kui peptiidi puhastamine SPPS-meetodit kasutades [17]. LPPS-meetodi puhul ei ole vaja kasutada nii suurt reagentide liiga kui SPPS-i puhul, mis on selle meetodi oluliseks eeliseks. Seetõttu on LPPS-meetod eelistatud suurte ainekoguste korral [24].

1.3. Asa-peptiidide süntees SPPS meetodil

Asa-aminohapped on ebastabiilsed molekulid, mistõttu kasutatakse asa-peptiidide sünteesil enamasti asa-aminohapete asemel nende prekursoreid – monoasendatud hüdrasiini molekule [25]. Kuna hüdrasiini molekul sisaldab kahte võrdse reaktsioonivõimega lämmastikuaatomit, on lämmastike eristamine ja asendusrühma selektiivne sisseviimine keeruline [26]. Asa-aminohapete prekursorite sünteesimiseks on kaks peamist meetodit (Joonis 5). Mõlema meetodi esimene etapp on hüdrasiini ühe lämmastiku sidumine kaitserühmaga. Ühe meetodi puhul alküülitakse monokaitstud hüdrasiini kaitsemata lämmastik alküülhaliidiga. Teise meetodi puhul pannakse monokaitstud hüdrasiin reageerima aldehüüdi või ketooni. Saadakse hüdrasoon, mis edasi redutseeritakse N-alküülhüdrasiiniks. [27, 28]



Joonis 5. Asa-aminohapete prekursorite süntees [27,28]. KR tähistab kaitserühma, X halogeeni, R ja R¹ kõrvalahelaid.

Asa-aminohappe prekursori sidumiseks peptiidiahela N-terminaaliga kasutatakse enamasti fosgeeni derivaate, näiteks BTC-d (bis(triklorometüül)karbonaat ehk trifosgeen) [29], mis on karbonüülrühma doonorid. Asa-aminohappe prekursori sidumine peptiidiahelaga on küll ligikaudu 100 korda aeglasem kui reaktsioon tavalise aminohappega, kuid kuna aminohapete külghelate steeriline takistus reaktsiooni ei mõjuta ning reaktsioon kulgeb peaaegu lõpuni, ei valmista see etapp asa-peptiidide sünteesil probleemi [28,30]. Küll aga on asa-peptiidide

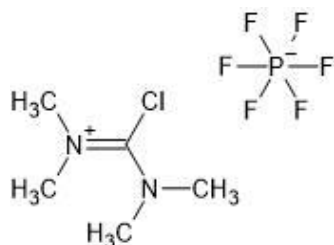
sünteesil probleemiks asa-aminohappejäägile järgmise aminohappe liitmine. See reaktsioon on palju aeglasem kui tavalisele aminohappejäägile järgmise aminohappe sidumine ning ka reaktsiooni saagis on enamasti madalam. Probleemi põhjus võib olla asa-aminohappe *N*-terminaali madalam nukleofiilsus võrreldes tavalise aminohappega. [4]

Asa-aminohappele järgmise aminohappe liitmise ehk asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni kiirus sõltub tugevalt kasutatavast aminohappe aktivaatorist. Seevastu tavapeptiidi sünteesi aktivaatori valik oluliselt ei mõjuta [5]. Mudelpeptiidiga H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ läbi viidud uuringutest on selgunud, et klassikalises peptiidsünteesis kasutatavatest aktivaatoritest parimaid tulemusi asa-peptiidide sünteesil annavad COMU (1-((1-(tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülidenaminooksü-)-dimetüülamino-morfolinometüleen))metaanamiinium heksafluorofosfaat) ja PyOxim (O-((tsüano(etoksükarbonüül)metüüliden)-amino)-üüloksütri(pürrolidino)-fosfoonium heksafluorofosfaat). Mõlemad aktivaatorid asendavad karboksüülse OH-rühma lahkuva rühmaga oksüma (etüül-2-tsüano-2-(hüdrosüimino)atsetaat). Reaktsiooni pseudo-esimest järku kiiruskonstandid (k_{obs}) nende aktivaatorite puhul on sarnased (COMU-ga $0,022 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ ja PyOxim-iga $0,023 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$) ja reaktsiooni saagised pärast 24 tunni möödumist on kõrged (vastavalt $0,99 \pm 0,01$ ja $0,95 \pm 0,01$). Siiski on reaktsioon umbes 30 korda aeglasem kui tavapeptiidi puhul. Teiste testitud aktivaatoritega on reaktsioon veel aeglasem ning ei kulge lõpuni. Näiteks aktivaatoriga TBTU (O-(bensotriasool-1-üül)-*N,N,N',N'*-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat), mis viib aminohappesse lahkuva rühma HOBt (1-hüdrosübensotriasool), on reaktsiooni saagis $0,69 \pm 0,05$ ja näiline kiiruskonstant $0,004 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. Seetõttu on vajalik asa-peptiidide sünteesiks leida uusi aktivaatoreid, mis asa-peptiidsideme tekke reaktsiooni oluliselt kiirendaksid. [4]

Tavapeptiidi sünteesi aminohapete kõrvalahelad oluliselt ei mõjuta. Lisatava aminohappe kõrvalahela steeriline takistus mõjutab aga tugevalt asa-peptiidsideme tekke reaktsiooni kiirust. Steeriliselt mahukama külghelaga aminohapete liitmine asa-aminohappejäägile on oluliselt aeglasem kui väiksema külghelaga aminohapete liitmine. Näiteks glütsiini liitmine asa-alaniinile on 28 korda kiirem kui reaktsioon isoleutsiiniga (k_{obs} vastavalt $0,0330 \pm 0,006 \text{ min}^{-1}$ ja $0,0012 \pm 0,00006 \text{ min}^{-1}$). [7] Samuti avaldab väga suurt mõju asa-peptiidsideme tekke reaktsiooni kiirusele ja saagisele asa-aminohappe kõrvalahel. COMU-ga aktiveeritud alaniini liitmine asa-glütsiinile kulgeb peaaegu lõpuni ja selle kiirus on võrreldav tavapeptiidide sünteesiga. Seevastu reaktsioon asa-valiiniga, millel on väga suur steeriline takistus, peaaegu ei toimu. [6]

1.4. Aminohappe aktivaator TCFH

Aminohappe aktivaatorit TCFH-d (Joonis 6) on testitud amiidsideme sünteesimiseks madala nukleofiilsusega amiini ja suure steerilise takistusega karboksüülhappe vahel. Leiti, et sellistes reaktsioonides annab TCFH kõrgeid saagiseid, kui alusena kasutada NMI-d. Teiste testitud alustega, näiteks DIPEA, tekkis amiidist rohkem anhüdriidi. Leiti ka, et TCFH koos alusega NMI toimib amiidsideme sünteesimiseks kõige efektiivsemalt atsetonitriili lahuses (saagis >99%). TCFH-d koos NMI-ga testiti ka peptiidsideme sünteesiks steeriliselt mahuka kõrvalahelaga aminohapete vahel ning saavutati suhteliselt kõrged saagised (ligikaudu 90%). Vähesel määral toimus aga epimerisatsioon, ehk osa aminohapet liitus peptiidiahelale L-konformatsioonis, osa D-konformatsioonis. [8]



Joonis 6. TCFH

TCFH-d on testitud ka asa-peptiidsideme sünteesimiseks steeriliselt mahuka asa-valiiniga. Türosiini sidumiseks asa-valiinile võrreldi aktivaatoreid BTC, PyBOP (bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidino-fosfoonium heksafluorofosfaat), COMU, TCFH ja Ghosez' reagent. TCFH koos alusega NMI andis selles reaktsioonis teistest kasutatud aktivaatoritest kõrgema saagise (89%). Leiti aga, et võis toimuda epimerisatsioon. Ka Ghosez' reagent andis võrdlemisi kõrge saagise (67%) ning epimerisatsiooni ei toimunud. Kummagi aktivaatoriga ei tuvastatud HPLC-MS analüüsil lähtepeptiidi. [9] Seetõttu testitakse meie uurimisgrupis ka Ghosez' reagenti aminohappe aktivaatorina asa-peptiidsideme sünteesil.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Kasutatud reaktiivid

Aine	Molaarmass (g/mol)	Puhtus (%)	Tootja
ACN (atsetonitriil)	41,05	≥ 99,8	Sigma-Aldrich
BTC	296,8	> 98%	Sigma-Aldrich
DCM (diklorometaan)	84,39	≥ 99,9	Honeywell/ Sigma-Aldrich
Dietüüleeter	74,12	99,89	Lach:ner
DIPEA	129,25	≥ 99	Sigma-Aldrich
DMF (<i>N,N</i> -dimetüülformamiid)	73,09	≥ 99,8	Honeywell
Etanool	46,07	96	Moe Piiritusetehas
Fenool	94,11	99,8	Lachner
Fmoc-Cl	258,70	-	Novabiochem
Fmoc-L-Ala-OH*H ₂ O	311,32+18,01	-	Iris Biotech GmbH
Fmoc-L-Phe-OH	387,43	-	Iris Biotech GmbH
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	459,54	-	Iris Biotech GmbH
HBTU (2-(1H-bensotriasool-1-üül)- 1,1,3,3-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat)	379,24	≥98	Novabiochem
HOBt	135,12	≥97	Sigma-Aldrich
K ₂ CO ₃	135,21	-	Keemiakaubandus AS
KCN	65,12	-	Chemapol

<i>N</i> -Fmoc- <i>N</i> '-metüülhüdrasiin	268,33	Kontrollitud tuumamagnetresonants- spektroskoopia abil	Sünteesitud A. Mastitski töögrupis
Ninhüdrin	178,14	≥99	Sigma-Aldrich
NMI	82,12	≥99,0	Sigma-Aldrich
Oxyma-B	185,1	99,9	Luxembourg Bio Technologies
Piperidiin	85,15	99	Sigma-Aldrich
Püridiin	79,10	≥ 99	Thermo Fisher Scientific
Rink Amiid MBHA vaik	-	-	Iris Biotech GmbH
TCFH	280,58	≥ 98	Luxembourg Bio Technologies
TFA (Trifluoroetaanhape)	114,02	-	Iris Biotech GmbH
TIS (Triisopropüülsilaan)	158,36	99	Aldrich Chemistry

2.2. Aparatuur

Proovide analüüs toimus Shimadzu LCMS-2020 kromatograafia. Seade oli varustatud kolonniga Phenomenex Kinetex 5 µM EVO (C18, 100 Å, 250 x 4,6 mm). Eluent koosnes kahest puhvrast: puhver A oli 0,1% TFA vesilahus, puhver B oli 0,1% TFA ACN-s. Kasutati UV-Vis detektorit lainepikkusel 254 nm või 220 nm ja massidetektorit. Massispektri mõõtmisel kasutati elektropihustusionisatsioonallikat (ESI) ja positiivset mõõtmisrežiimi.

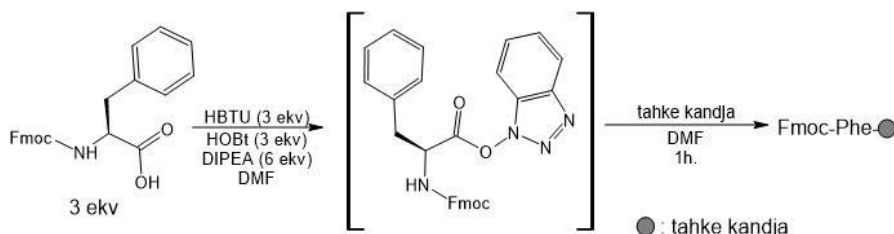
Andmeid analüüsiti programmiga LabSolutions Version 5.82 SP1. Arvutuste tegemiseks ja graafikute koostamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5 Version 5.04.

TLC testi jaoks kasutati silikageeliga kaetud alumiiniumfooliumil, mille poori suurus oli 60 Å ja osakeste läbimõõt 9,5 – 11,5 µm. Laike visualiseeriti UV-kiirguse abil, mille lainepikkus oli 254 nm.

2.3. Fmoc-asaAla-Phe-vaik süntees

2.3.1. Fenüülalaniini sidumine tahkele kandjale

Süntees viidi läbi vastavalt artiklis [4] kasutatud eeskirjale (Joonis 7), kuid aktivaatorina kasutati TBTU asemel HBTU-d.



Joonis 7. Fenüülalaniini tahkele kandjale sidumise reaktsiooniskeem

Filterkolonni kaaluti 250 mg Rink Amiid MBHA vaiku (0,68 mmol/g; 1 ekv) ning sellel lasti 20 minutit DCM-is punduda. Seejärel lisati kolonni Fmoc-kaitserühma eemaldamiseks 20%-ilist piperidiini lahust DMF-is. Pärast 2 minuti möödumist vahetati piperidiini lahus uue vastu ja reaktsioonil lasti toimuda veel 20 minutit. Vaiku pesti 5 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga. Fmoc-kaitserühma eemaldumist kontrolliti TLC testi abil: proovid vaigu pesemislahustest kanti TLC plaadile ning kontrolliti laikude UV-aktiivsust.

3 ekv aminohapet Fmoc-L-Phe-OH lahustati 2 ml DMF-s. Samuti valmistati lahused 3 ekv HOBt-ist 1 ml DMF-is ja 3 ekv aktivaatorist HBTU-st 1 ml DMF-is. Aminohappe lahusele lisati 6 ekv DIPEA-d, seejärel ühendati kõik lahused. Saadud lahus lisati vaigule.

Reaktsioonil lasti toimuda 1 h. Vaiku pesti 3 korda DMF-iga, 3 korda DCM-iga, 3 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga. Peptiidsideme tekkimise kontrollimiseks kasutati Kaiseri testi.

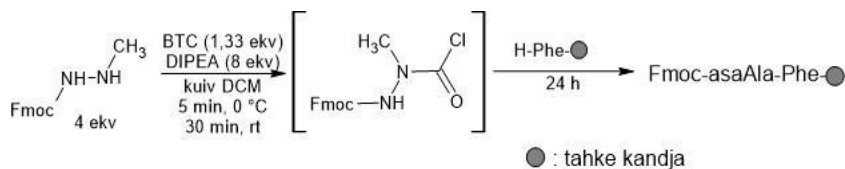
2.3.2. Kaiseri test

Kaiseri testis [22] kasutatakse kahte lahust A ja B. Lahuse A valmistamiseks lahustati 4 g fenooli 1 ml etanoolis. Seejärel lahustati 6,5 mg KCN-i 10 ml vees ja 0,2 ml seda lahust lisati 10 ml püridiinile. Saadud lahused ühendati. Lahus B on ninhüdriini 5% lahus etanoolis.

Pliit soojendati 105 °C-ni. Katseklaasi lisati võrdses koguses lahuseid A ja B ning mõned vaigugraanulid. Segu kuumutati pliidil 5 minutit. Kui segu või graanulid värvusid siniseks, leidis vabasid aminorühmasid. Kui segu ega graanulite värv ei muutunud, ei leidunud vabasid aminorühmasid.

2.3.3. Asa-alaniini sidumine fenüülalaniinile

Süntees viidi läbi vastavalt artiklis [30] kasutatud eeskirjale, kuid reagentide ekvivalente vähendati (**Joonis 8**).



Joonis 8. Asa-alaniini fenüülalaniinile sidumise reaktsiooniskeem

Valmistati ette 25 ml ümarkolb: kolbi kuumutati leegis ja jahutati lämmastikuvoos, misjärel kolb suleti kummiseptumiga. Kolbi kaaluti 4 ekv asa-alaniini prekursorit *N*-Fmoc-*N'*-metüülhüdraasiin ja see lahustati 9,5 ml kuivas DCM-is. Lisati ka 8 ekv DIPEA-d. Lahust jahutati jäävannis ja läbi septumi kinnitati kolvile lämmastikuga täidetud õhupall.

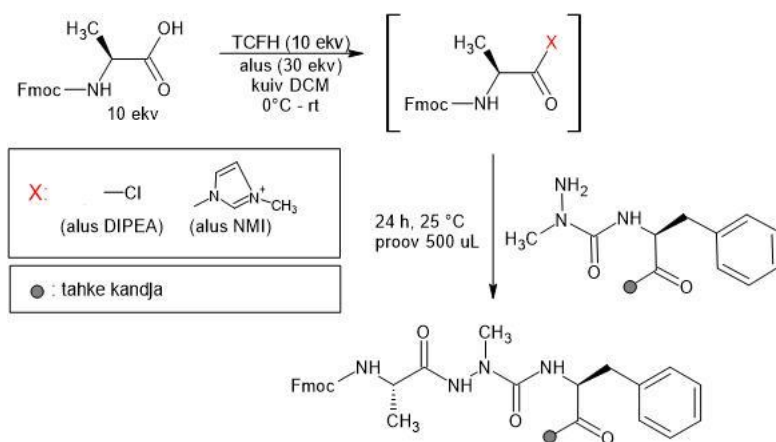
Kaaluti 1,33 ekv BTC-d ja see lahustati 0,5 ml kuivas DCM-is. BTC lahus lisati asa-alaniini prekursorile. Reaktsioonil lasti pidevalt segades toimuda 5 min jäävannis ja 30 min toatemperatuuril.

Tahke kandjaga seotud fenüülalaniinilt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu kirjeldatud peatükis 2.3.1. Fmoc-kaitserühma eemaldamise edukust kontrolliti Kaiser testi ja TLC-testi abil.

Asa-alaniini prekursori lahus lisati fenüülalaniinile. Kolbi pesti väikese hulga kuiva DCM-iga. Reaktsioonil lasti kulgeda 24 h. Vaiku pesti 3 korda DMF-iga, 3 korda DCM-iga, 3 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga. Reaktsiooni toimumise kontrollimiseks analüüsiti väikest kogust saadud asa-peptiidi HPLC-MS meetodil (Lisa 1). Esmalt seoti proovis sisalduvale reageerimata fenüülalaniinile tagasi Fmoc-kaitserühm. Kaaluti 6 mg Fmoc-Cl ja see lahustati 3 ml-s DCM-is. Proovi sisaldavasse filtersüstlasse lisati saadud lahus ja katalüütiline kogus K_2CO_3 . Reaktsioonil lasti toimuda 1 h. Süstalt pesti 3 korda DMF-iga, 2 korda Milli-Q® veega, 1 kord DMF-iga ja 3 korda DCM-iga. Seejärel eemaldati asa-peptiid vaigult, nagu kirjeldatud peatükis 2.5.

2.4. Ala-asaAla-Phe-vaik ja Tyr-asaAla-Phe-vaik süntees

Süntees viidi läbi vastavalt artiklis [4] kasutatud kineetiliste mõõtmiste eeskirjale, mida kohandati vastavalt artiklis [9] kasutatud eeskirjale (Joonis 9).



Joonis 9. Asa-peptiidideme sünteesimise reaktsiooniskeem.

Kaaluti 60 mg asa-dipeptiidi Fmoc-asaAla-Phe-vaik 10 ml filtersüstlasse ning lasti 20 minutit DCM-is punduda. Asa-dipeptiidilt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu on kirjeldatud peatükis 2.3.1.

Valmistati lahus 10 ekv aminohapest Fmoc-L-Ala-OH ja 30 ekv DIPEA-st või NMI-st 5 ml kuivas DCM-is. Samuti valmistati lahus 10 ekv aktivaatorist TCFH 500 μl -s kuivas DCM-is. Lahused jahutati jäävannis. Asa-dipeptiid kanti üle 50 ml tsentrifuugituubi. Ülekandmiseks kasutati kuiva DCM-i. Ühendati aminohappe ja aktivaatori lahused, lahusel lasti soojeneda toetemperatuurini ja seejärel lisati see asa-dipeptiidile. Samal hetkel käivitati stopper. Pärast kõigi lahuste ühendamist oli reaktsioonisegu ruumala 10 ml.

Reaktsioonil lasti toimuda 24 h vesivannis 25 °C juures. Reaktsiooni kineetika jälgimiseks võeti 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h ja 24 h pärast reaktsiooni algust reaktsioonisegust proovid. Selleks võeti automaatpipetiga 500 μl reaktsioonisegu nii, et kaasa tuleksid ka mõned vaigu terakesed. Proov viidi 5 ml filtersüstlasse ja reaktsiooni peatamiseks lisati kohe ligikaudu 1 ml DMF-i. Proovi pesti veel 1 kord DCM-iga, 2 korda DMF-iga, 2 korda Milli-Q[®] veega, 2 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga.

Osades proovides seoti reageerimata asa-dipeptiidile (H-asaAla-Phe-vaik) uuesti Fmoc-kaitserühm, nagu kirjeldatud peatükis 2.3.3. Ülejäänud proovides eemaldati asa-tripeptiidilt Fmoc-kaitserühm nii, nagu kirjeldatud peatükis 2.3.1. Proove analüüsiti HPLC-MS meetodil.

Samamoodi sünteesiti ka asa-tripeptiid Tyr-asaAla-Phe-vaik. Alusena kasutati NMI-d. Reaktsioonisegust võetud proovidelt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu kirjeldatud peatükis 3.2.1. Asa-peptiid eemaldati tahkelt kandjalt, nagu kirjeldatud peatükis 2.5. Proove analüüsiti HPLC-MS meetodil.

2.5. Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt

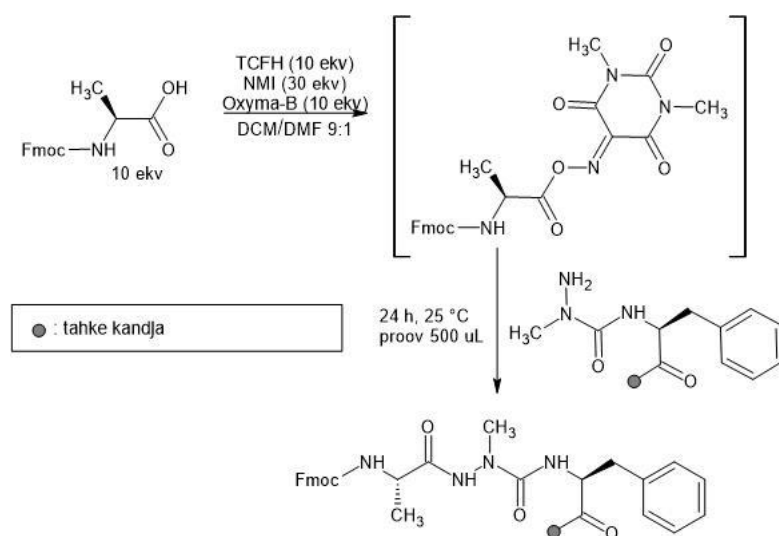
Asa-peptiid eemaldati tahkelt kandjalt vastavalt artiklis [4] kasutatud eeskirjale.

Valmistati 1 ml lahust, mis sisaldas mahu järgi 95% TFA-d, 2,5% Milli-Q[®] vett ja 2,5% TIS-i. Lahus lisati proovi sisaldavasse süstlasse. Reaktsioonil lasti toimuda 2 h. Lahustunud asa-peptiid viidi 2 ml katsutisse. Süstalt pesti väikese koguse TFA-ga, mis lisati asa-peptiidi lahusele. TFA aurustati suruõhu abil, kuni lahust oli alles vähem kui 0,25 ml.

Järelejäänud lahusele lisati 1,5 ml külma dietüüleetrit, saadud segu loksutati ja tsentrifuugiti. Pipeti abil eemaldati segu pinnalt 0,5 – 0,6 ml dietüüleetrit ja lisati 0,5 ml külma dietüüleetrit. Tsentrifugimist ja seejärel dekanteerimist viidi läbi 3 korda. Viimaseks aurustati dietüüleeter täielikult.

2.6. Ala-asaAla-Phe-vaik ja Tyr-asaAla-Phe-vaik süntees koos lisandiga Oxyma-B

Süntees viidi läbi vastavalt artiklis [4] kasutatud kineetiliste mõõtmiste eeskirjale, mida kohandati vastavalt artiklites [9] ja [31] kasutatud eeskirjadele (Joonis 10).



Joonis 10. Asa-peptiidsideme sünteesimise reaktsiooniskeem lisandiga Oxyma-B

Kaaluti 60 mg asa-dipeptiidi Fmoc-asaAla-Phe-vaik 10 ml filtersüstlasse ning lasti 20 minutit DCM-is punduda. Asa-dipeptiidilt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu on kirjeldatud peatükis 2.3.1.

Valmistati lahus 10 ekv aminohappest Fmoc-L-Ala-OH ja 30 ekv NMI-st 5 ml-s DCM-is. Samuti valmistati lahus 10 ekv aktivaatorist TCFH 500 µl-s DCM-is ja lahus 10 ekv lisandist Oxyma-B 1 ml-s DMF-is. Asa-dipeptiid kanti üle 50 ml tsentrifuugituubi. Ülekandmiseks kasutati kuiva DCM-i. Ühendati aminohappe, lisandi ja aktivaatori lahused ja saadud lahus

lisati asa-dipeptiidile. Samal hetkel käivitati stopper. Pärast kõikide lahuste ühendamist oli reaktsioonisegu ruumala 10 ml.

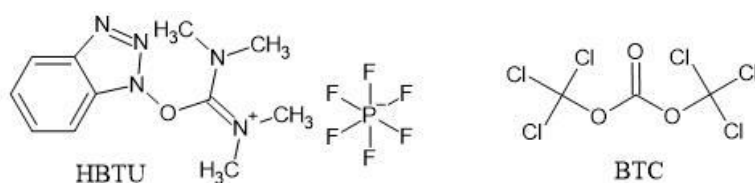
Reaktsioonil lasti toimuda 24 h vesivannis 25 °C juures. Proovide võtmine ja nende edasine töötlemine toimus samamoodi, nagu kirjeldatud peatükkides 2.4. ja 2.5. Kõikidelt reaktsioonisegust võetud proovidelt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu kirjeldatud peatükis 3.2.1. Asa-peptiid eemaldati tahkelt kandjalt, nagu kirjeldatud peatükis 2.5. Proove analüüsiti HPLC-MS meetodil.

Samamoodi sünteesiti ka asa-tripeptiid Tyr-asaAla-Phe-vaik. Kõikidelt reaktsioonisegust võetud proovidelt eemaldati Fmoc-kaitserühm nii, nagu kirjeldatud peatükis 3.2.1. Asa-peptiid eemaldati tahkelt kandjalt, nagu kirjeldatud peatükis 2.5. Proove analüüsiti HPLC-MS meetodil.

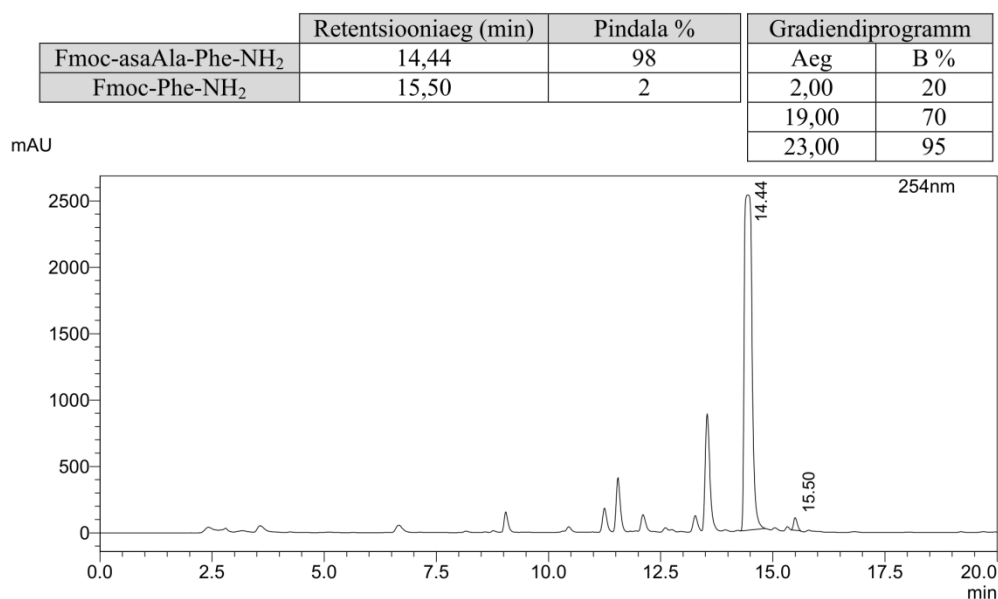
3. Tulemused ja arutelu

Töös uuriti asa-peptiidsideme moodustumist mudelpeptiidides Ala-asaAla-Phe-NH₂ ja Tyr-asaAla-Phe-NH₂. Alaniini ja türosiini aktiveerimiseks kasutati TCFH-d koos erinevate aluste ja lisanditega. Alust varieeriti, sest sõltuvalt kasutatavast alusest või lisandist on aminohappesse viidav lahkuv rühm erinev. Aktivaatori testimine toimus koostöös ettevõttega Luxembourg Bio Technologies ning aluste ja lisandite valikul lähtuti ettevõtte soovitudest. TCFH kasutamisel sünteesis lähtuti artiklis [9] toodud eeskirjast ja meie uurimisgrupis varasemalt läbi viidud uuringutest [4,7,30]. Atsüülimisreaktsioon aktiveeritud aminohappe ja asa-dipeptiidi vahel viidi läbi aminohappe kümnekordses ülehulgas 25 °C juures ja reaktsioonisegust võeti proovid kindlate ajavahemike järel. Reaktsiooni jälgiti 24 tundi. Proove analüüsiti HPLC-MS meetodil ja kasutati gradiendiprogrammi, mis kromatografeerimise ajal muutis puhvri B sisaldust eluendis (puhvrite A ja B koostis vt ptk 2.2.). Kõik proovid lahustati eluendis. Asa-tripeptiidi tekkimise saagis määrati kromatogrammilt asa-dipeptiidi ja asa-tripeptiidi piikide pindalade suhte järgi.

Asa-dipeptiid Fmoc-asaAla-Phe-vaik sünteesiti vastavalt meie uurimisgrupis varasemalt kasutatud eeskirjadele, vt peatükk 2.3.1 Joonis 7 ja peatükk 2.3.3. Joonis 8 [4,7,30]. Fenüülalaniini aktiveerimiseks kasutati aktivaatorit HBTU [32] ning asa-alaniini prekursori aktiveerimiseks aktivaatorit BTC [29] (Joonis 11), mis on karbonüülrühma doonor. Fenüülalaniini sidumine viidi läbi aminohappe kolmekordses liias ning sidumise edukust kontrolliti Kaiseri testiga, mis ei näidanud vabade aminorühmade olemasolu. Asa-aminohappe prekursori sidumine viidi läbi prekursori neljakordses liias. Asa-dipeptiidi analüüsiti HPLC-MS meetodil, et kontrollida, kui palju sisaldub selles reageerimata fenüülalaniini. Intensiivsema neelduvuse saavutamiseks seoti enne analüüsimist reageerimata fenüülalaniinile tagasi Fmoc-kaitserühm. Kromatogrammilt oli näha, et reageerimata fenüülalaniini oli umbes 2%, seega atsüülimisreaktsioon kulges peaaegu lõpuni (Joonis 12, Lisa 1).



Joonis 11. Aktivaatorite HBTU ja BTC struktuurid



Joonis 12. Fmoc-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm

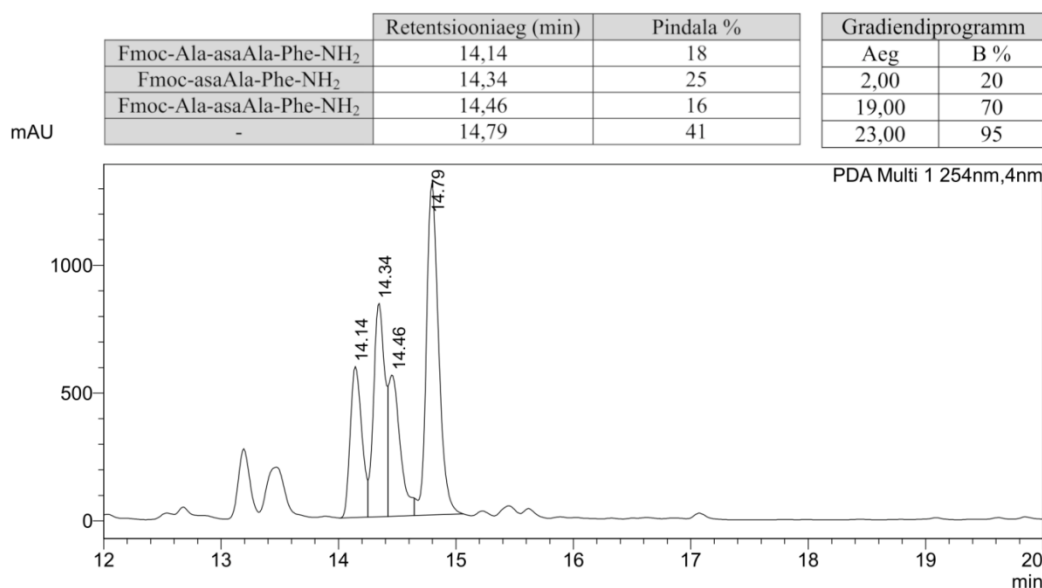
3.1. Aktivaator TCFH alusega DIPEA mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH₂ sünteesil

Esmalt sünteesiti mudelpeptiid Ala-asaAla-Phe-NH₂, kasutades asa-peptiidsideme moodustamiseks TCFH-d koos mittenukleofiilse tertsiarse alusega DIPEA. Sellisel juhul on aktiveeritud aminohappes lahkuvaks rühmaks Cl (vt peatükk 2.4. Joonis 9). Aluse DIPEA kasutamist soovitas ettevõtte Luxembourg Bio Technologies, sest atsüülkloriidid on väga reaktsioonivõimelised. Samas võib nende kasutamisega peptiidsünteesis kaasneda mitmete kõrvalproduktide teke [18].

Esimeses katses analüüsiti Fmoc-Ala-asaAla-Phe-vaik sünteesi reaktsioonisegust võetud proove, milles reageerimata lähteainele oli Fmoc-kaitserühm tagasi pandud. Kuna analüüsis kasutati UV-Vis detektorit, loodeti Fmoc-kaitserühma abil saavutada suurem neelduvus ja seega ka intensiivsemad piigid. Piikide intensiivsus oli tõesti suurem kui ilma Fmoc-kaitserühmata proovide puhul, kuid paraku oli lahutuvus halb ja piikide pindalade määramine keeruline. Fmoc-kaitserühma eemaldamine või sidumine oli vajalik selleks, et HPLC analüüsil UV-Vis detektoriga oleksid asa-dipeptiidi ja asa-tripeptiidi neelduvused võrreldavad.

Koos Fmoc-kaitserühmaga analüüsitud proovide kromatogrammidel oli näha väga selge piik, millele vastas massi-laengu suhe (m/z) 458 (Joonis 13, Lisa 2). Massi-laengu suhte järgi võis tegu olla Fmoc-Ala-Phe-NH₂-ga, kuid arvestades asa-dipeptiidi Fmoc-asaAla-Phe-NH₂ HPLC-MS analüüsil nähtud fenüülalaniini väikest hulka (Joonis 12), oli selle piigi pindala oodatust oluliselt suurem. Kuna sellest reaktsioonisegust samal ajal võetud proovi ilma Fmoc-

kaitserühmata analüüsides sellist piiki ei nähtud (Joonis 14), on see siiski ebatõenäoline. Produktile Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH₂ vastavat m/z väärtust 530 oli näha kahes erinevas piigis (Joonis 13). Mõlemad piigid olid aga liiga lähedal teistele piikidele, et nende pindalaid selgelt määrata saaks. 24 h proovis olid mõlema produktile vastava piigi pindalad ligikaudu võrdsed, varasemates proovides aga oli selgelt eristuv vaid üks neist (Lisa 3, Lisa 4). Kahe produkti piigi esinemine kromatogrammil viitab epimerisatsiooni toimumisele, mida TCFH-d kasutades on täheldatud ka varem [9].

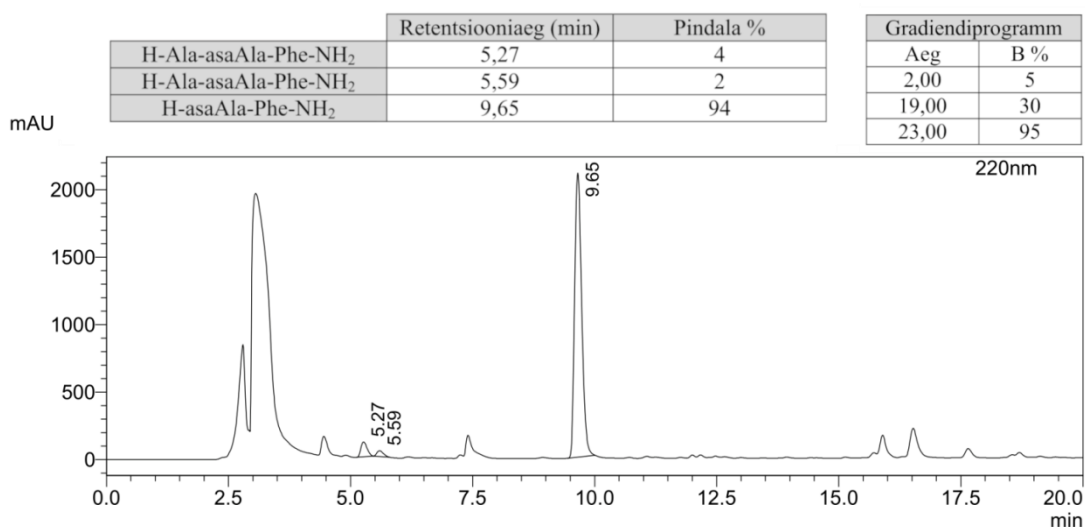


Joonis 13. Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus DIPEA, 24 h proov

Gradiendiprogrammi varieerides prooviti kromatogrammide lahutuvust parandada, kuid see ei õnnestunud. Seetõttu otsustati edasisi proove analüüsida ilma Fmoc-kaitserühmata.

Sooritati korduskatse, kuid seekord eemaldati analüüsitavatelt proovidelt Fmoc-kaitserühm. Nende proovide kromatogrammidel oli samuti selgelt näha lähteaine piik ($m/z [M + Na] = 261$, Joonis 14, Lisa 5). Samuti oli näha kahte produkti piiki ($m/z = 308$), mis viitab epimerisatsiooni toimumisele. Produkti tekkis aga väga vähe ja aeglaselt. 24 h kromatogrammilt on näha, et ära oli reageerinud ligikaudu 5% lähteainest. Kahtlustati, et TCFH võib olla lagunenu, mistõttu korrati katset värskest avatud TCFH-ga, kuid tulemused ei paranenud.

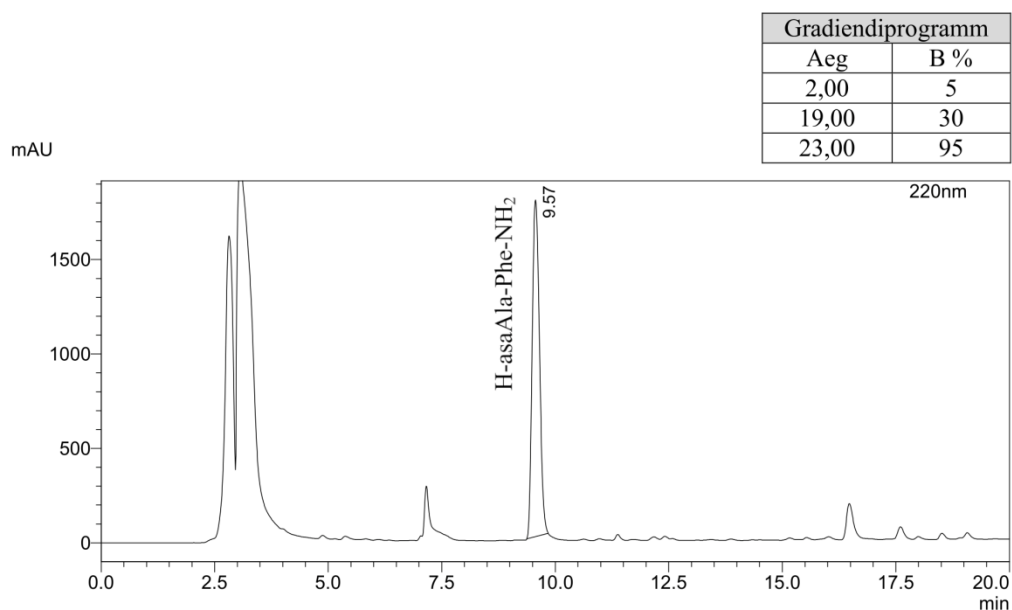
Kuna asa-peptiidside teke on enamasti väga aeglane, võis siin madala saagise põhjuseks olla mitte otseselt aktiveeritud aminohappe reaktsioonivõime, vaid atsüülkloriidi lagunemine reaktsioonikeskkonnas. Ettevõtte Luxembourg Bio Technologies andmetel võis atsüülkloriid laguneda paari tunni jooksul. Samuti võis saagis väheneda kõrvalreaktsioonide tõttu.



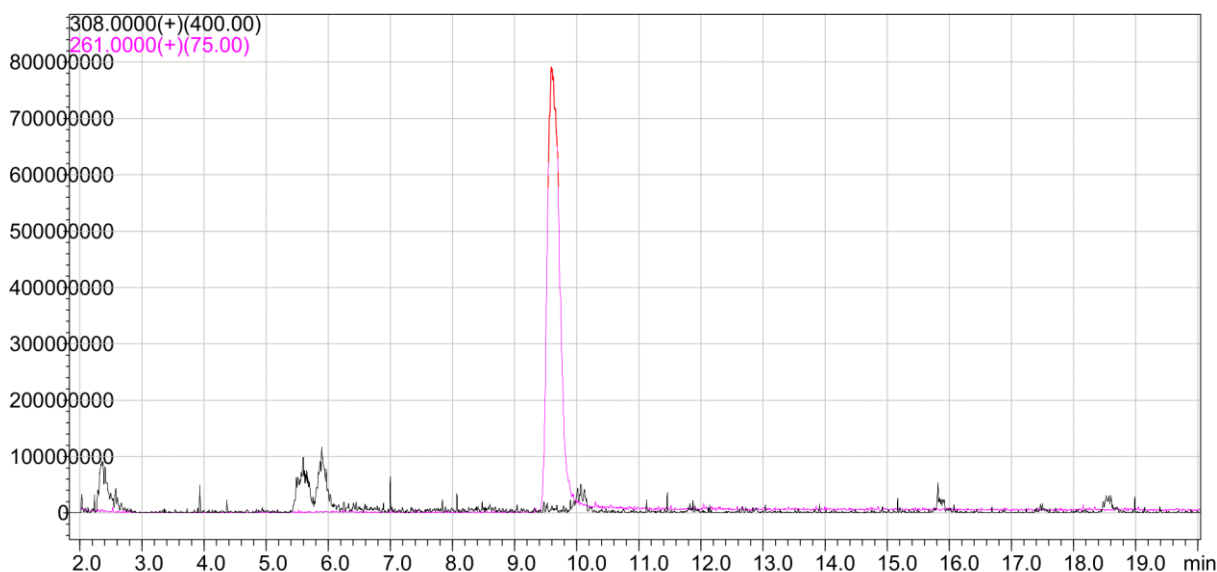
Joonis 14. H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus DIPEA, 24 h proov

3.2. TCFH alusega NMI mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH₂ sünteesil

Järgmiseks testiti TCFH-d mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH₂ sünteesimiseks, kasutades alusena NMI-d (vt Joonis 9). Kuigi aktiveeritud aminohappe struktuur on erinev, sest NMI käitub aminohappe aktiveerimisel nukleofiilina, olid tulemused üpris sarnased alusega DIPEA saadud tulemustele. Lähteaine piik oli kromatogrammidel selgelt näha (Joonis 15). Produkt tuvastati aga ainult MS abil, kromatogrammil piike näha ei olnud. Produkt jõudis massispektromeetrisse kahes jaos, mistõttu esines tõenäoliselt ka epimerisatsioon (Joonis 16).



Joonis 15. H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus NMI, 24 h proov



Joonis 16. H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ massikromatogramm; alus NMI, 24 h proov. Piike on võimendatud. Must joon on asa-tripeptiid H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ (m/z = 308), roosa joon on asa-dipeptiid H-asaAla-Phe-NH₂ (m/z = 261).

Et kontrollida, kas madalat saagist võis põhjustada kasutatav korgiga katseklaasis hoitud NMI, korraldati katset originaalpudelis NMI-ga, kuid tulemused ei paranenud. On võimalik, et saagis oli väike kõrvalreaktsioonide tõttu, mistõttu oleks vaja analüüsida reaktsioonisegus leiduvaid kõrvalprodukte, mis selles töös proovidest välja pesti, ning tahke kandjaga seotud kõrvalprodukte. Kuna TCFH koos NMI-ga on amiidsideme sünteesimisel madala nukleofiilsusega amiinidega andnud väga kõrgeid saagiseid [8], ei saa välistada, et siin võivad madalad saagised tuleneda atsüülimidiasooli lagunemisest reaktsioonikeskkonnas.

3.3. TCFH alusega NMI ja lisandiga Oxyma-B mudelpeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH₂ sünteesil

Järgmiseks uuriti lisandi Oxyma-B mõju reaktsioonile (vt Joonis 10). Lisandeid nagu Oxyma-B [31] ja HOBt [33] kasutatakse epimerisatsiooni vältimiseks. Kuna Oxyma-B ei lahustu DCM-is, testiti esmalt reagentide segu lahustuvust erinevates lahustites. Selgus, et kui Oxyma-B esmalt lahustada DMF-is, ülejäänud reagentid DCM-is, ning saadud lahused ühendada, ei ole lahustuvusega probleeme. Nõnda kasutati edaspidi Oxyma-B lahustamiseks DMF-i ning lõplik lahusti koosnes ühest osast DMF-ist ja 9-st osast DCM-ist.

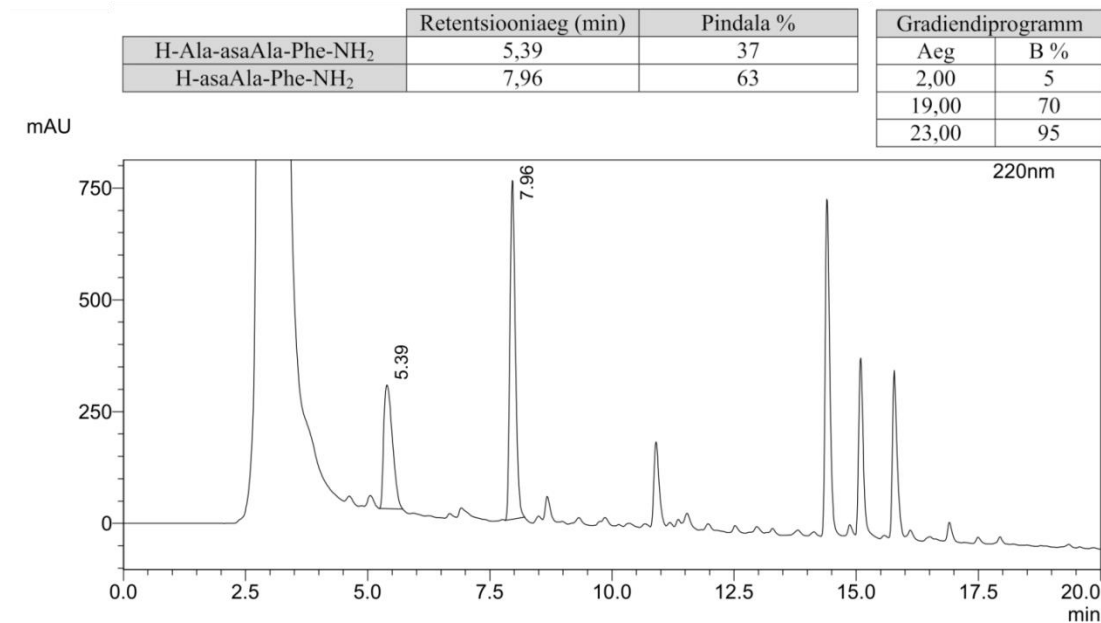
Proovide kromatogrammidel oli selgelt näha lähteaine piik ja üks produkti piik, seega epimerisatsiooni lisandit kasutades ei toimunud (Joonis 17). Reaktsiooni saagis oli oluliselt kõrgem kui eelmistes katsetes, mistõttu sooritati korduskatsed ja koostati reaktsiooni

kineetiline kõver (Joonis 18). Kokku sooritati kolm korduskatset. Kuna reaktsioon viidi läbi aminohappe 10-kordses liias, saab reaktsiooni kiirust kirjeldada esimest järku võrrandiga

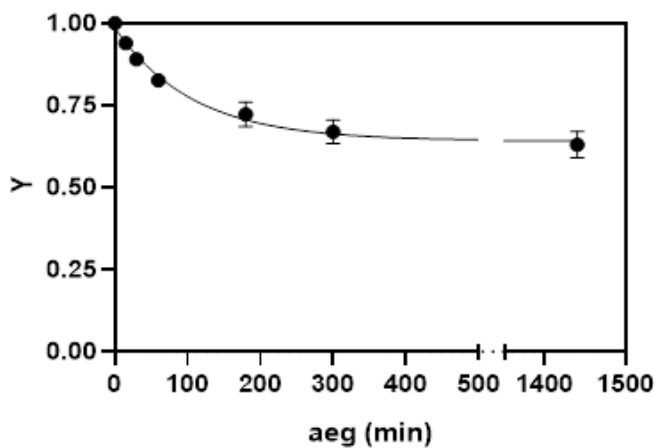
$$Y = e^{k_{obs}t} + Y_{\infty}, \text{ kus}$$

$$Y = \frac{S_{dipeptiid}}{S_{dipeptiid} + S_{stripeptiid}}, \text{ } k_{obs} \text{ on reaktsiooni näiline kiiruskonstant, } t \text{ on reaktsiooni aeg ja } Y_{\infty}$$

on Y väärtus reaktsiooni lõpus. S on piigi pindala. [4] Arvutuste tegemiseks ja graafiku koostamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5.



Joonis 17. H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus NMI, lisand Oxyma-B, 24 h proov



Joonis 18. TCFH-ga (alus NMI, lisand Oxyma-B) aktiveeritud Fmoc-alaniini ja asa-dipeptiidi H-asaAla-Phe-vaik vahelise reaktsiooni kineetiline kõver

Kuigi reaktsiooni saagis koos lisandiga oli kõrgem kui eelmistes katsetes, jääb TCFH-ga saavutatud saagis alla kõikidele teistele meie uurimisgrupis sama mudelpeptiidi sünteesimiseks testitud aktivaatoritele. Ka reaktsiooni näiline kiiruskonstant oli võrdlemisi madal. Alaniini sidumisel asa-alaniinile erinevate aktivaatoritega saadud kiiruskonstandid ja saagised on esitatud Tabel 1. Ka selles katses võisid probleemiks olla aktiveeritud aminohappe lagunemine ja kõrvalreaktsioonid.

Tabel 1. Erinevate aktivaatoritega läbi viidud kineetiliste mõõtmiste tulemused mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH₂. Lahustina kasutati DMF-i, alusena DIPEA-d. Reaktsioon viidi läbi 25 °C juures. [4]

Aktivaator	Lahkuv rühm	$k_{\text{obs}}, \text{min}^{-1}$	Saagis (1-Y _∞)
COMU	oksüma	0,022 ± 0,001	0,99 ± 0,01
PyOxim	oksüma	0,023 ± 0,001	0,95 ± 0,01
HDMC ¹	6-Cl-HOBt	0,016 ± 0,001	0,55 ± 0,02
HCTU ²	6-Cl-HOBt	0,017 ± 0,002	0,68 ± 0,03
HATU ³	HOAt ⁴	0,017 ± 0,001	0,93 ± 0,01
TCFH⁵	Oxyma-B	0,009 ± 0,001	0,36 ± 0,01
BTC ⁶	Cl	0,0053 ± 0,0006	0,67 ± 0,03
TBTU	HOBt	0,004 ± 0,001	0,69 ± 0,05
PyBOP	HOBt	0,005 ± 0,002	0,65 ± 0,14

¹ [(5-Kloro-3-oksidobensotriasool-3-ium-1-üül)-morfoliin-4-üülmetüüldieen]-dimetüülasaanium heksafluorofosfaat

² O-(6-Klorobensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat

³ O-(7-Asabensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat

⁴ 1-Hüdroksü-7-asabensotriasool

⁵ Alus NMI, lisand Oxyma-B. Lahusti DCM. Lahkuv rühm tuleneb siin lisandist.

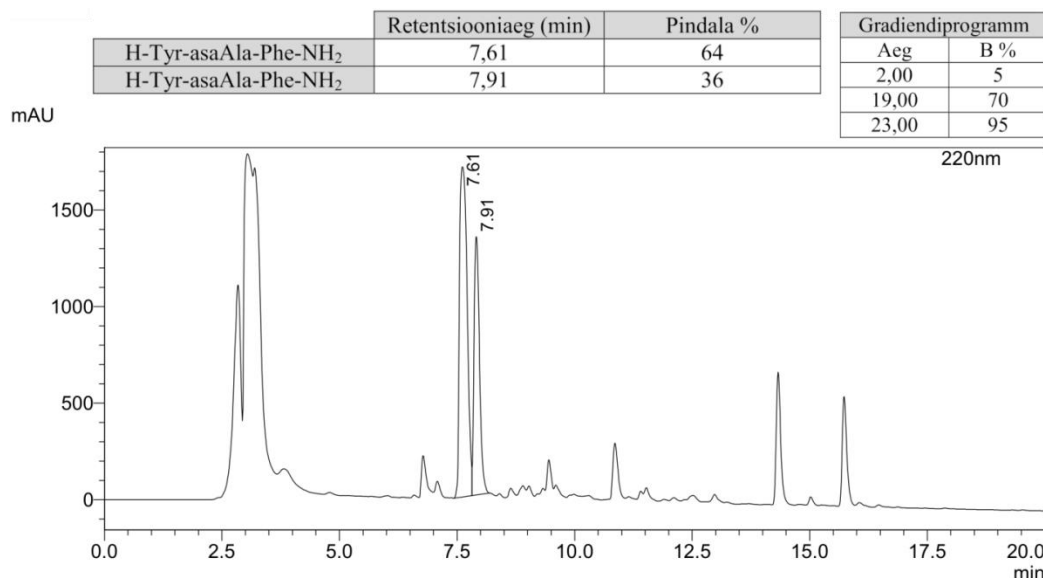
⁶ [34], lahusti DCM.

3.4. TCFH alusega NMI mudelpeptiidi Tyr-asaAla-Phe-NH₂ sünteesil

Kuna TCFH koos NMI-ga oli vaatamata epimerisatsioonile andnud kõrge saagise, kui asa-valiinile liideti türosiin [9], otsustati kontrollida, kas TCFH annab kõrgema saagise, kui seda kasutada asa-alaniinile türosiini liitmiseks. On näidatud, et asa-aminohappele seotava aminohappe külghela steerilise takistuse suurenemine vähendab oluliselt reaktsiooni kiirust. Türosiin on küll steeriliselt mahukama kõrvalahelaga kui alaniin, kuid kuna türosiini puhul võib induktsiooniefekt suurendada karbonüülrühma elektrofiilsust, ei pruugi see reaktsiooni kiirust oluliselt aeglustada. On leitud, et fenüülalaniini, mille kõrvalahel on samuti aroomaatne, asa-alaniinile sidumise kiirus on sarnane alaniini sidumise kiirusega (kiiruskonstandid

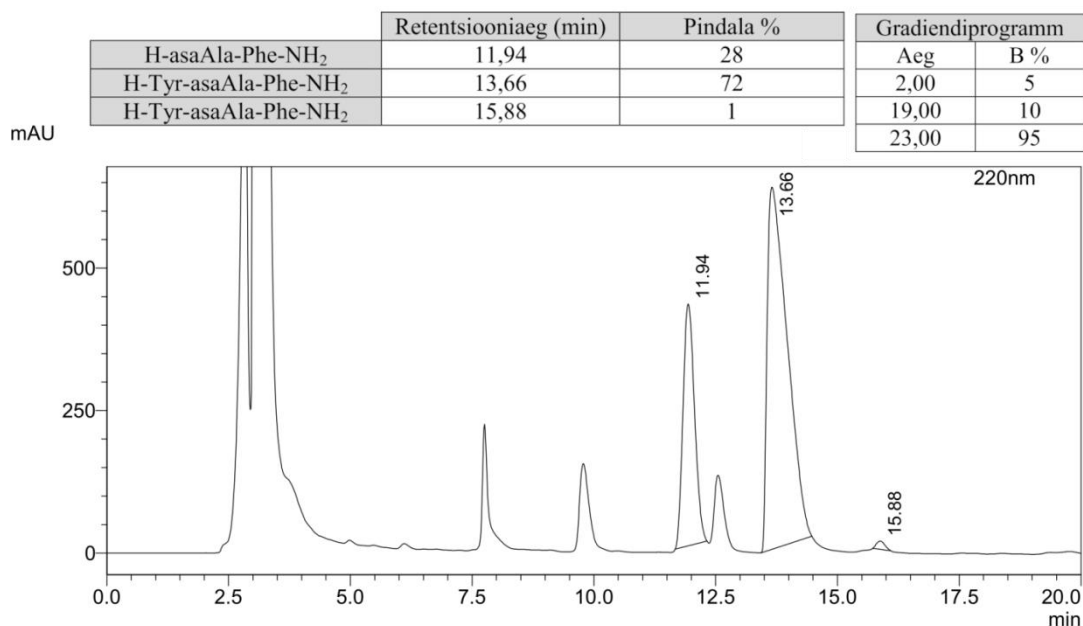
vastavalt $0,209 \pm 0,001$ ja $0,0217 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$). [7]

24 h proovi kromatogrammil oli selgelt näha kaks produkti H-Tyr-asaAla-Phe-NH₂ piiki, mis viitab epimerisatsioonile (Joonis 19). Lähteaine piiki kromatogrammil ei olnud, ning lähteainet ei tuvastatud selgelt ka MS-i abil. 5 h proovi kromatogrammil ei olnud samuti lähteaine piiki, kuid lähteaine tuvastati MS-i abil (Lisa 6). Reaktsioonisegust varem võetud proovide kromatogrammidel oli olemas ka lähteaine piik (Lisa 7). Seega reageeris 24 tunni jooksul ära kogu asa-dipeptiid.



Joonis 19. H-Tyr-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus NMI, 24 h proov

Kuna toimus epimerisatsioon, otsustati asa-tripeptiid H-Tyr-asaAla-Phe-NH₂ sünteesida ka koos lisandiga Oxyma-B. Kromatogrammidel oli endiselt näha kaks produkti piiki, kuid üks oli teisest oluliselt väiksem, seega epimerisatsioon toimus vaid vähesel määral (Joonis 20). Kõikide proovide kromatogrammidel oli näha ka lähteaine piik. Peatükis 3.1. kirjeldatud probleemide tõttu analüüsiti proove ilma Fmoc-kaitserühmata. Kuna asa-dipeptiid sisaldas ühte aromaatsset rühma, asa-tripeptiid aga kahte, ei olnud nende neelduvused tõenäoliselt võrreldavad ning piikide pindalade suhe ei pruukinud vastata kontsentratsioonide suhtele. Nendel põhjustel ei määratud reaktsiooni kiiruskonstanti. See reaktsioon toimus aga selgelt aeglasemalt ja saagis oli väiksem kui katses, kus Oxyma-B-d ei kasutatud. Reaktsiooni saagise vähenemist lisandi Oxyma-B kasutamisel on täheldatud ka meie laboris tehtud eelkatsetes, kus asa-valiini seoti TCFH abil türosiini. Reaktsioon türosiini ja asa-alaniini vahel oli siiski kiirem kui reaktsioon türosiini ja asa-valiini vahel. Arvestades, et asa-valiin on steeriliselt mahukama kõrvalahelaga kui asa-alaniin, oli see ootuspärane [6].



Joonis 20. H-Tyr-asaAla-Phe-NH₂ kromatogramm; alus NMI, lisand Oxyma-B, 24 h proov

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et asa-peptiidsideme moodustamise edukus kasutades aminohappe aktiveerimiseks TCFH-d sõltub liidetava aminohappe struktuurist ja tõenäoliselt ka asa-aminohappe struktuurist. Selles töös kasutatud aminohappejärjestuste sünteesimiseks ei ole TCFH testitud reaktsioonitingimustel sobiv aktivaator, kuid TCFH võib siiski sobida mõne muu aminohappejärjestuse sünteesimiseks. Peamiseks probleemiks TCFH kasutamisel asa-peptiidsideme sünteesimiseks on epimerisatsioon, mida saab lisandeid kasutades küll vähendada, kuid ka reaktsiooni saagis võib sellisel juhul väheneda. Selles töös testiti ainult ühte lisandit, seega võib olla võimalik saagise vähenemise probleemi vältida, kasutades mõnda muud lisandit. Selles töös ei uuritud lahusti mõju reaktsioonile. Arvestades, et asa-tripeptiidi Ala-asaAla-Phe-NH₂ sünteesil Oxyma-B-d kasutades saavutati oluliselt kõrgem reaktsiooni saagis kui eelnevates katsetes, kusjuures see katse erines eelnevatest ka lahusti poolest, ning artiklis [8] TCFH ja NMI-ga erinevates lahustites saavutatud saagiste erinevust, võib lahusti mõju olla märkimisväärne. Samuti ei uuritud töös aktivaatori, aluse ja lisandi hulga ning nende vahekorra mõju reaktsioonile. Kuna madalate saagiste üks põhjus võis olla aminohappe aktiveeritud vormi lagunemine, tuleks veel testida, kas tulemused paraneksid, kui lähtepeptiidile lisada reagente mitu korda. Samuti oleks vaja määrata nii tahke kandjaga seotud kui ka reaktsioonikeskkonnas lahustunud kõrvalprodukte, et täpsemalt mõista, millised kõrvalreaktsioonid läbi viidud katsetes toimusid.

Kokkuvõte

Selles töös uuriti asa-peptiidside moodustumist mudelpeptiidides Ala-asaAla-Phe-NH₂ ja Tyr-asaAla-Phe-NH₂, kasutades aminohappe aktivaatorina TCFH-d. TCFH-d testiti koos alustega DIPEA ja NMI ning ka koos lisandiga Oxyma-B. Kasutatavast alusest või lisandist sõltus lahkuv rühm, millega asendati aminohappe karboksüülne OH-rühm.

Asa-peptiidside moodustumist jälgiti 24 h jooksul ning reaktsioonisegust võetud proove analüüsiti HPLC-MS meetodil. Reaktsiooni saagis määrati kromatogrammilt, arvutades asa-dipeptiidi ja asa-tripeptiidi piikide pindalade suhte.

Mudelpeptiidis Ala-asaAla-Phe-NH₂ olid reaktsiooni saagised madalad. Koos alusega DIPEA oli saagis pärast 24 tunni möödumist ligikaudu 6%. Koos alusega NMI asa-tripeptiidi kromatogrammidel ei tuvastatud, kuid asa-tripeptiid tuvastati siiski MS-i abil. Mõlemal juhul toimus ka epimerisatsioon. Kui epimerisatsiooni allasurumiseks kasutati lisandit Oxyma-B, tõusis reaktsiooni saagis 36%-ni ning epimerisatsiooni ei tuvastatud. Selle reaktsiooni näiline kiiruskonstant oli $k_{\text{obs}} = 0,009 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. Tulemused jäid siiski oluliselt alla samas mudelpeptiidis varem testitud aminohappe aktivaatoritele.

Mudelpeptiidis Tyr-asaAla-Phe-NH₂ olid reaktsiooni saagised seevastu oluliselt kõrgemad. Lisandit kasutamata reageeris ära kogu lähteaine, kuid toimus epimerisatsioon. Lisandit kasutades õnnestus küll epimerisatsioon maha suruda, kuid reaktsiooni saagis vähenes oluliselt.

Saadud tulemuste põhjal ei ole TCFH testitud mudelpeptiidides ja reaktsioonitingimustel sobilik aktivaator asa-peptiidside sünteesimiseks, sest saagised on madalad või toimub epimerisatsioon. TCFH-d tuleks aga veel testida, varieerides lahustit, lisandit, reagentide hulkasid ning aminohappe ja asa-aminohappe struktuuri.

Summary

Formation of the aza-peptide bond in model peptides Ala-azaAla-Phe-NH₂ and Tyr-azaAla-Phe-NH₂ was observed. The amino acid was activated using the activator TCFH with DIPEA or NMI as the base and with the additive Oxyma-B. The leaving group that the carboxylic OH-group of the amino acid is replaced with depends on the base or additive used.

Formation of the aza-peptide bond was observed for 24 hours and samples taken from the reaction mixture were analyzed using HPLC-MS. Reaction yield was calculated from the peak areas of the aza-dipeptide and aza-tripeptide from the chromatogram.

When synthesizing the model peptide Ala-azaAla-Phe-NH₂, yields were low. Using DIPEA as the base, the yield was around 6%. Using NMI as the base, the reaction product was not visible on the chromatogram at all, though the aza-tripeptide was detected with MS. In both cases, possible epimerization was also detected. When the additive Oxyma-B was used to suppress epimerization, the yield rose to 36% and epimerization was indeed not detected. The observed rate constant of this reaction was $k_{\text{obs}} = 0,009 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. These results were, however, still significantly worse than those achieved with other activators that have been tested by our research group.

In the model peptide Tyr-azaAla-Phe-NH₂, the reaction yields were significantly higher. When the additive Oxyma-B was not used, the coupling was nearly complete, but epimerization was detected. While the additive did suppress the epimerization, it also significantly lowered the yield.

Based on these results, it can be said that TCFH is not a suitable amino acid activator for synthesizing these peptide sequences when using the tested reaction conditions, as the yields were low or epimerization was detected. However, it is necessary to further test TCFH for the synthesis of the aza-peptide bond by varying the solvent, additive, reagent amounts and the structures of both the amino acid and aza-amino acid.

Kasutatud kirjandus

1. Tal-Gan, Y.; Freeman, N. S.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Metabolic Stability of Peptidomimetics: N-Methyl and Aza Heptapeptide Analogs of a PKB/Akt Inhibitor. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2011**, 78 (5), 887–892.
2. 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.
3. Zega, A. Azapeptides as Pharmacological Agents. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12 (5), 589–597.
4. 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.
5. Chantell, C. A.; Onaiyekan, M. A.; Menakuru, M. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Comparative Study of Different Activators. *J. Pept. Sci.*, **2012**, 18 (2), 88–91.
6. 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.
7. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **2018**, 59 (21), 2010–2013.
8. Beutner, G. L.; Young, I. S.; Davies, M. L.; Hickey, M. R.; Park, H.; Stevens, J. M.; Ye, Q. TCFH–NMI: Direct Access to N-Acyl Imidazoliums for Challenging Amide Bond Formations. *Org. Lett.*, **2018**, 20 (14), 4218–4222.
9. McMechen, M. A.; Willis, E. L.; Gourville, P. C.; Proulx, C. Aza-Amino Acids Disrupt β -Sheet Secondary Structures. *Molecules*, **2019**, 24 (10), 1919.
10. McGregor, D. P. Discovering and Improving Novel Peptide Therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2008**, 8 (5), 616–619.
11. Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43 (10), 3575–3594.
12. Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational Properties of Azapeptides. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, **1999**, 469 (1), 63–76.
13. Reynolds, C. H.; Hormann, R. E. Theoretical Study of the Structure and Rotational Flexibility of Diacylhydrazines: Implications for the Structure of Nonsteroidal Ecdysone Agonists and Azapeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118 (39), 9395–9401.
14. Chrisp, P.; Goa, K. L. Goserelin. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Clinical Use in Sex Hormone-Related Conditions. *Drugs*, **1991**, 41 (2), 254–288.
15. Harrison, T. S.; Scott, L. J. Atazanavir. *Drugs*, **2005**, 65 (16), 2309–2336.
16. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 (14), 2149–2154.
17. Musaimi, O. A.; Torre, B. G. de la; Albericio, F. Greening Fmoc/tBu Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chem.*, **2020**, 22 (4), 996–1018.
18. Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg, 1993, pp 10–11, 63, 254–255.

19. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.*, **2006**, *33* (3), 239–254.
20. *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Workbench ed.; Murray Goodman, Arthur Felix, Luis Moroder, Claudio Toniolo, Eds.; Methoden der organischen Chemie Erweiterungs- und Folgebände zur 4. Auflage; Thieme: Stuttgart, 2004, pp 6-10.
21. El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.*, **2011**, *111* (11), 6557–6602.
22. 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.
23. Bayer, E.; Mutter, M.; Uhmman, R.; Polster, J.; Mauser, H. Kinetic Studies of the Liquid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96* (23), 7333–7336.
24. Takahashi, D.; Yamamoto, T. Development of an Efficient Liquid-Phase Peptide Synthesis Protocol Using a Novel Fluorene-Derived Anchor Support Compound with Fmoc Chemistry; AJIPHASE®. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53* (15), 1936–1939.
25. Freeman, N. S.; Hurevich, M.; Gilon, C. Synthesis of *N'*-Substituted Ddz-Protected Hydrazines and Their Application in Solid Phase Synthesis of Aza-Peptides. *Tetrahedron*, **2009**, *65* (8), 1737–1745.
26. Garcia-Ramos, Y.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Synthesis of Hydrazine and Azapeptide Derivatives by Alkylation of Carbazates and Semicarbazones. *Can. J. Chem.*, **2012**, *90* (11), 985–993.
27. Fan Cheng, K.; VanPatten, S.; He, M.; Al-Abed, Y. Azapeptides -A History of Synthetic Milestones and Key Examples. *Curr. Med. Chem.*, **2022**, *29* (42), 6336–6358.
28. Ploom, A.; Mastitski, A.; Arujõe, M.; Troska, A.; Järv, J. Aza-Peptides: Expectations and Reality. *Proc. Est. Acad. Sci.*, **2022**, *71* (3), 241.
29. André, F.; Marraud, M.; Tsouloufis, T.; Tzartos, S. J.; Boussard, G. Triphosgene: An Efficient Carbonylating Agent for Liquid and Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. Application to the Synthesis of Two Aza-Analogues of the AChR MIR Decapeptide. *J. Pept. Sci.*, **1997**, *3* (6), 429–441.
30. 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.
31. Jad, Y. E.; Khattab, S. N.; Torre, B. G. de la; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma-B, an Excellent Racemization Suppressor for Peptide Synthesis. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12* (42), 8379–8385.
32. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30* (15), 1927–1930.
33. König, W.; Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem. Ber.*, **1970**, *103* (3), 788–798.
34. Härk, Heleri. Aza-Peptiidisideme Moodustumine Aktivaatoriga Trifosgeen. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, 2018.

Lisa 1

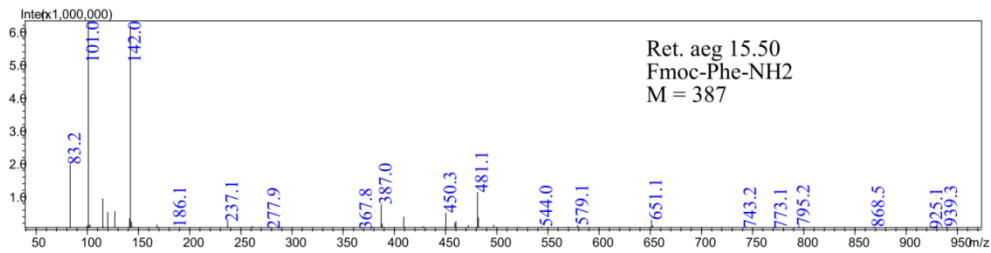
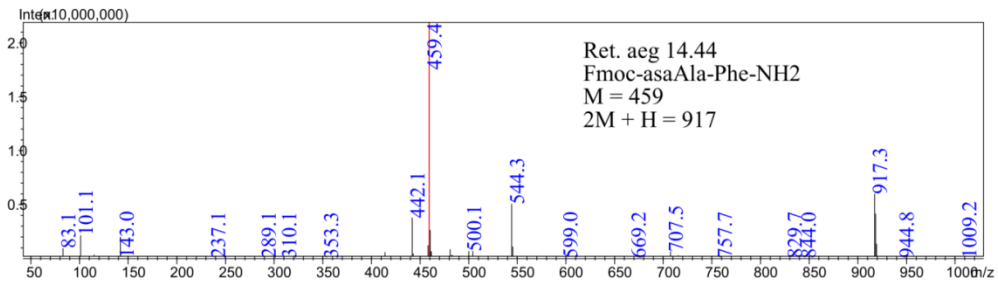
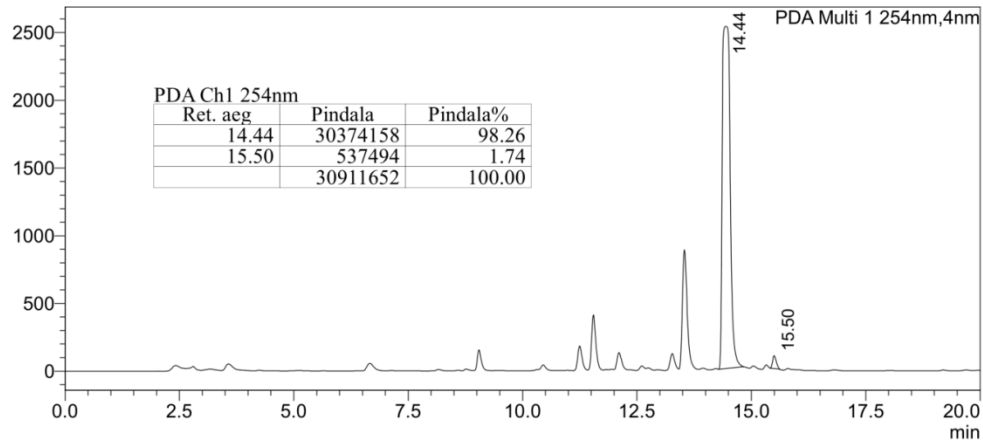
Fmoc-asaAla-Phe-NH2
10.07.2024-11.07.2024

Aeg	B%
2.00	20
19.00	70
23.00	96

Failinimi: Annika15.lcd
Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
Möödetud: 7/17/2024 12:56:42 PM

mAU



Lisa 2

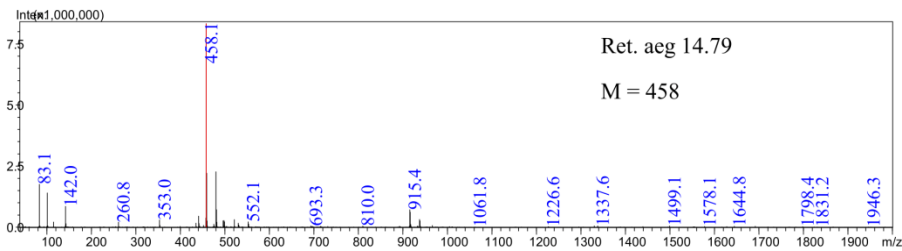
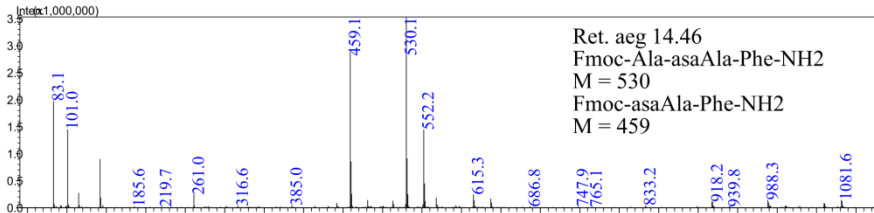
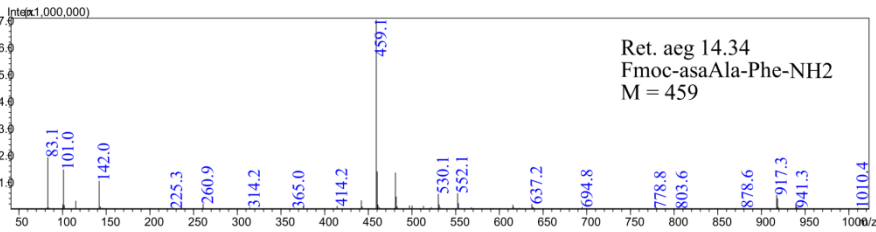
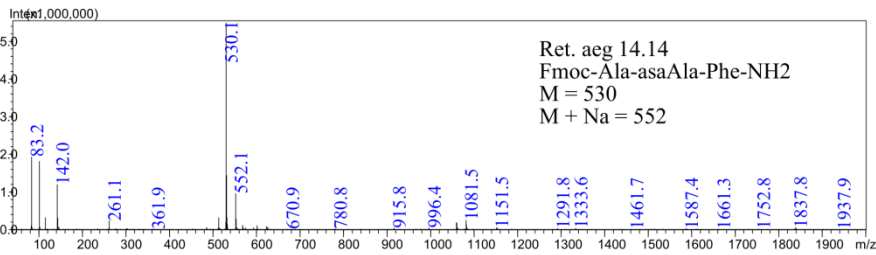
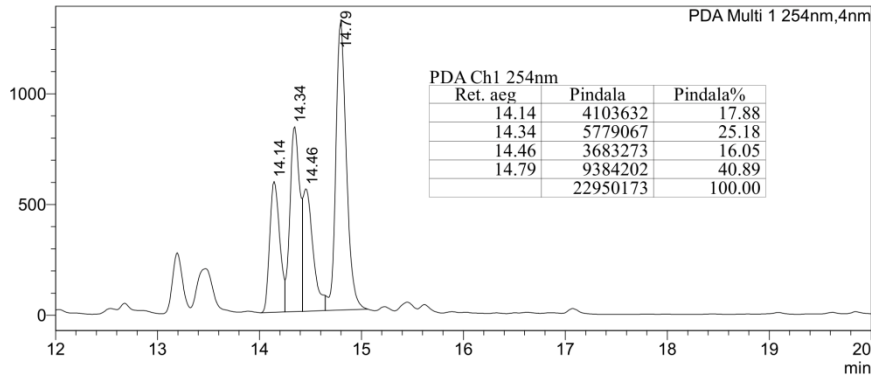
Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH2 24h
 TCFH/DIPEA
 DCM
 30.01.2024

Aeg B%
 2 20
 19 70
 23 95

Fallinimi: Annika4.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 2/8/2024 12:47:01 PM

mAU



Lisa 3

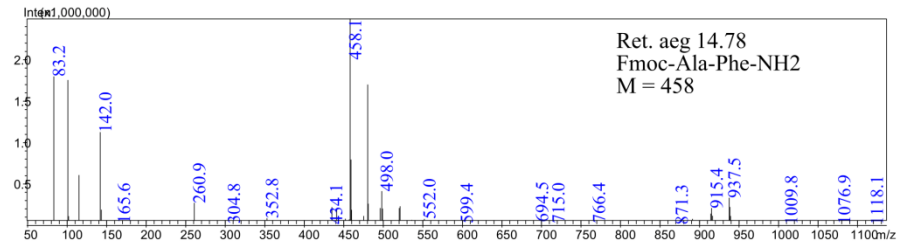
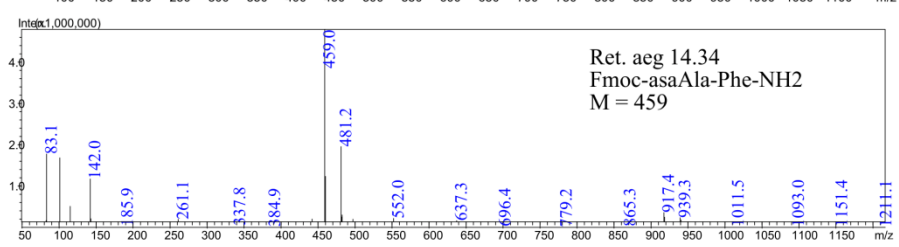
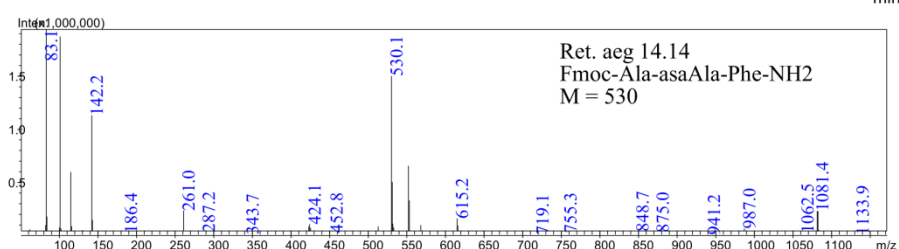
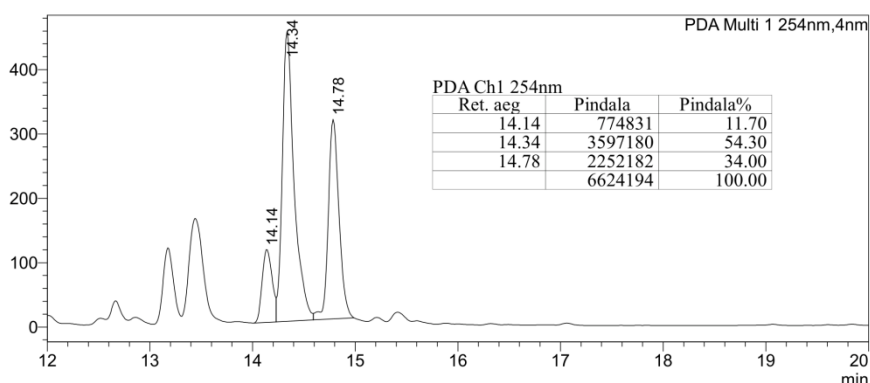
Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH2 5h
 TCFH/DIPEA
 DCM
 30.01.2024

Aeg B%
 2 20
 19 70
 23 95

Failinimi: Annika6.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 2/8/2024 2:31:48 PM

mAU



Lisa 4

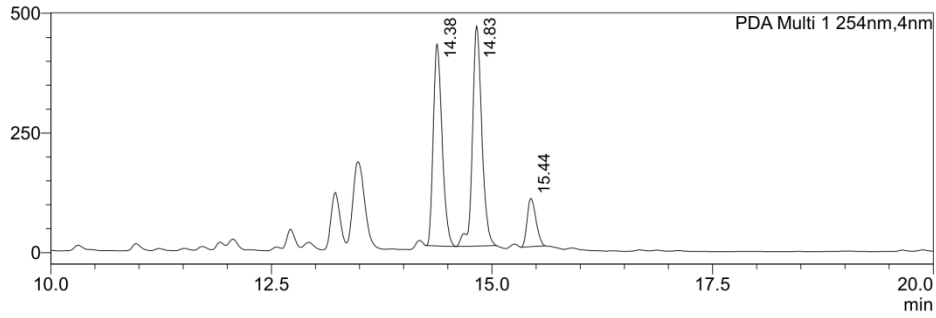
Fmoc-Ala-asaAla-Phe-NH2 15 min
 TCFH/DIPEA
 DCM
 30.01.2024

Aeg B%
 2 20
 19 70
 23 95

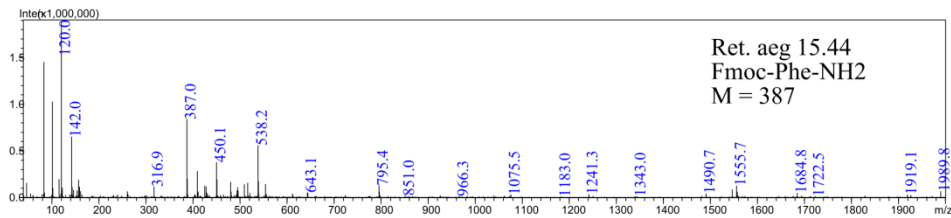
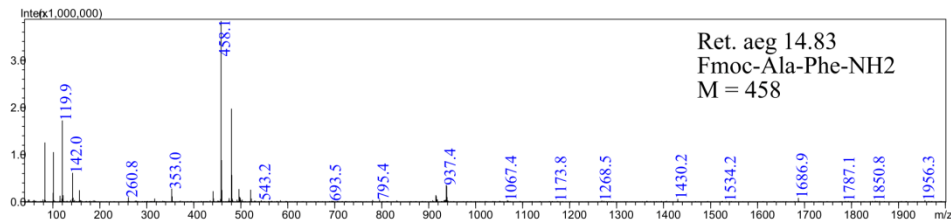
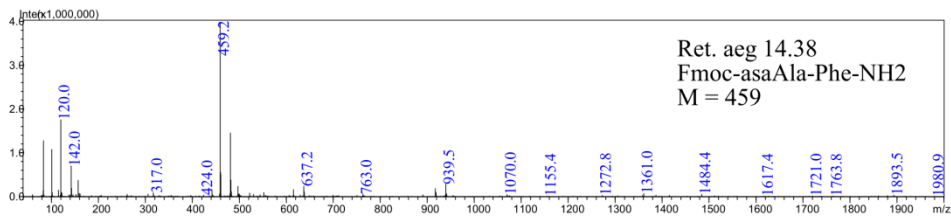
Failinimi: Annika8.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 2/23/2024 11:48:29 AM

mAU



PDA Ch1 254nm		
Ret. aeg	Pindala	Pindala%
14.38	2944825	41.78
14.83	3406194	48.33
15.44	697343	9.89
	7048362	100.00



Lisa 5

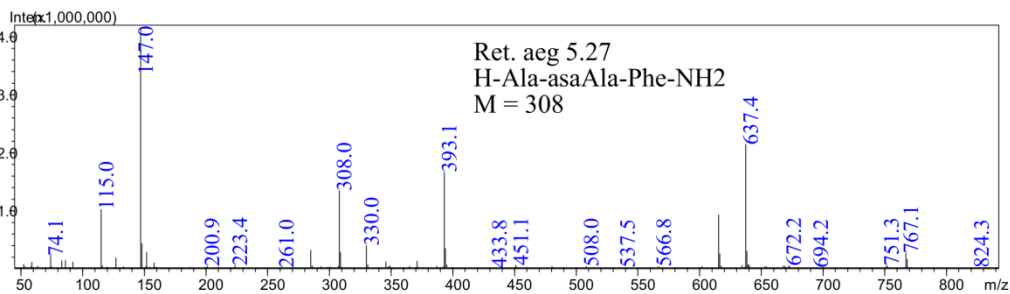
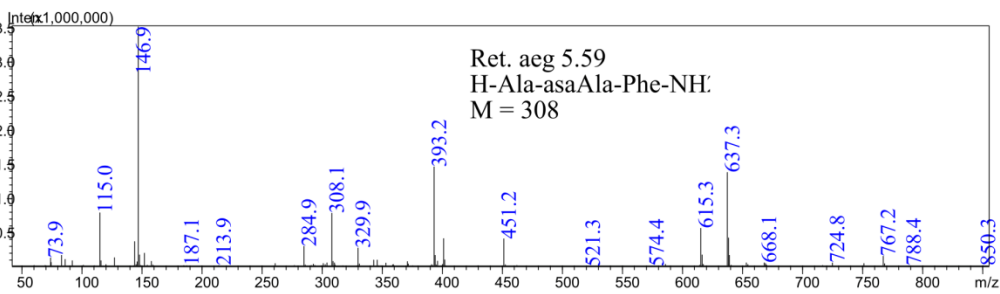
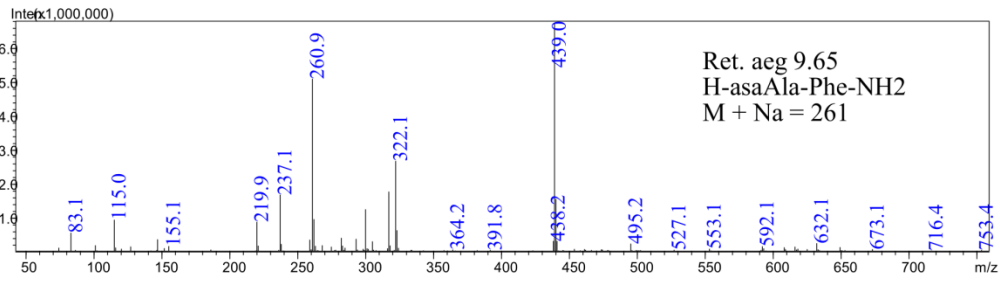
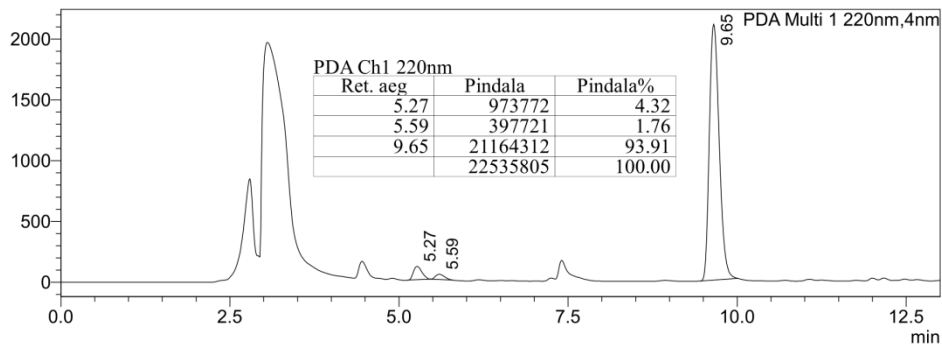
H-Ala-asaAla-Phe-NH2 24 h
 TCFH/DIPEA
 DCM
 26.03.2024

Aeg	B%
2	5
19	30
23	95

Failinimi: Annika10.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 4/2/2024 10:24:10 AM

mAU



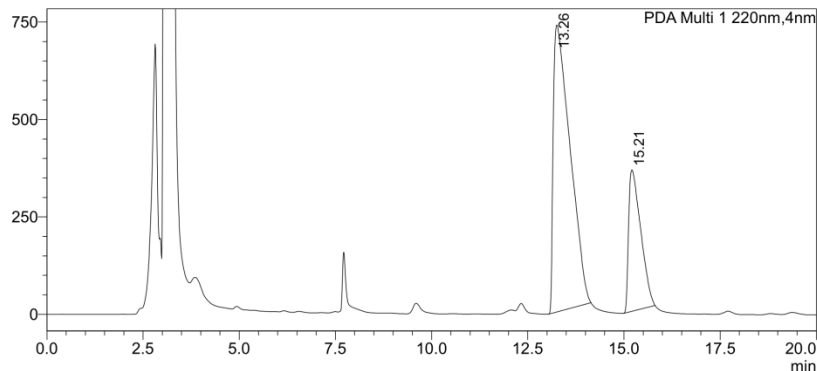
Lisa 6

H-Tyr-asaAla-Phe-NH2
 5 h
 TCFH/NMI
 DCM
 30.01.2025

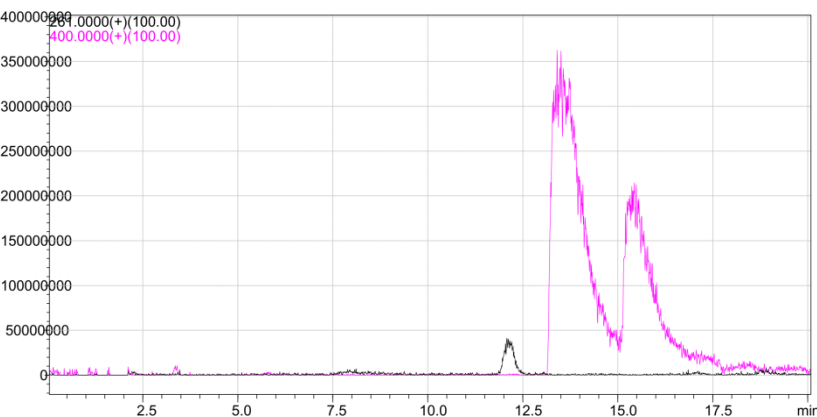
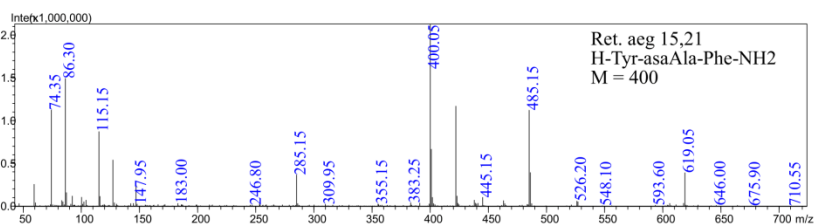
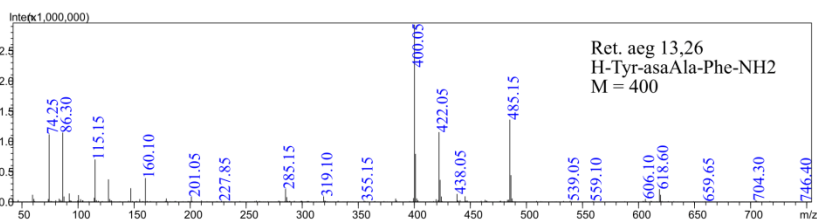
Aeg B%
 2 5
 19 10
 29 95

Failinimi: Annika57.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 5/19/2025 4:58:55 PM
 mAU



Ret. aeg	Pindala	Pindala%
13.26	22288223	73.71
15.21	7949484	26.29
	30237706	100.00



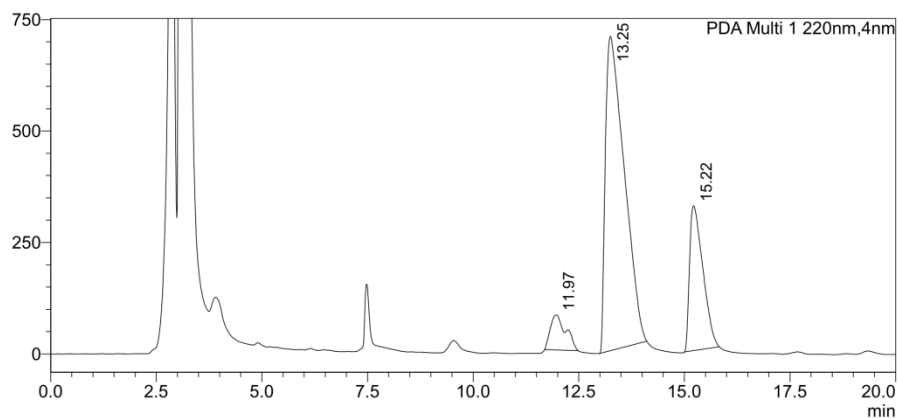
Lisa 7

H-Tyr-asaAla-Phe-NH2
 30 min
 TCFH/NMI
 DCM
 30.01.2025

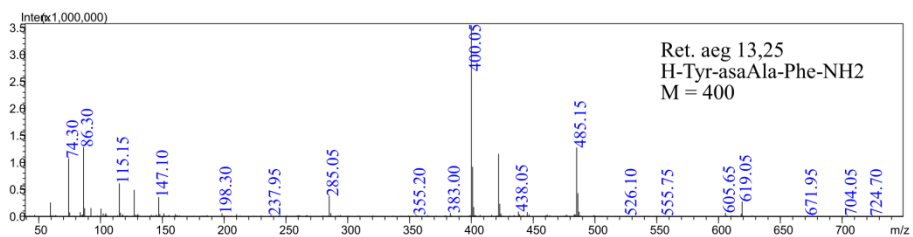
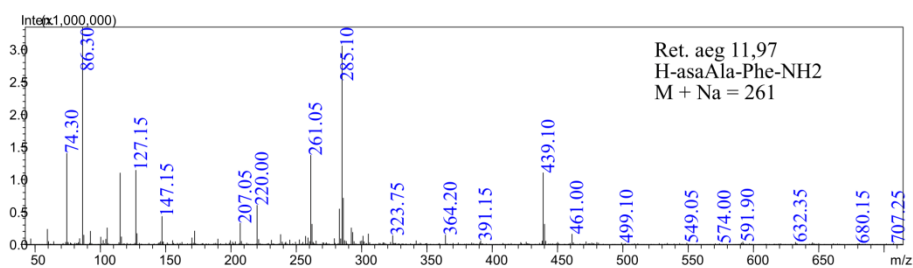
Aeg B%
 2 5
 19 10
 29 95

Failinim: Annika55.lcd
 Meetod: Alla_work.lcm

40 uL
 Mõõdetud: 5/19/2025 3:21:16 PM
 mAU



Ret. aeg	Pindala	Pindala%
11.97	1997846	6.43
13.25	21938771	70.59
15.22	7142251	22.98
	31078868	100.00



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annika Prillop,

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

„Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga TCFH“,

mille juhendaja on Anu Ploom (PhD),

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi 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;

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

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

Annika Prillop

27.05.2025