

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Cynthia Noormets

Asa-valiini sisaldavate asa-peptiidide süntees

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: Anu Ploom, PhD

Alla Troska-Palla, MSc

Tartu 2024

Asa-valiini sisaldavate asa-peptiidide süntees

Peptidomimeetikud on modifitseeritud peptiidid, mille üheks näiteks on asa-peptiidid. Peptiidide struktuurimuutuste eesmärgiks on parandada nende omadusi, et neid saaks kasutada näiteks paremate ravimikandidaatidena. Asa-peptiidide uurimist takistab nende sünteesimeetodite piiratus, kuna traditsioonilises tahkefaasi peptiidisünteesi (SPPS) meetodid alati ei toimi. Asa-peptiidisideme moodustamise efektiivsust mõjutab suuresti asa-aminohappe külgrühma steeriline takistus ning parimate saagiste saamiseks tuleb leida sobivad aktivaatorid ja nende kasutamise meetodika.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida aminohappe aktivaatorite TCFH ja Ghosez reagenti efektiivsust asa-peptiidisideme moodustamisel steriliselt mahukaima asa-aminohappega, asa-valiiniga (asaVal). Aktivaatoreid testiti esmalt mudelpeptiidides H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ ja H-Ser-asaVal-Phe-NH₂. Seejärel sünteesiti PKA miinimumsubstraadi RRASVA asa-analoog RRASasaVA. Selgus, et Ghosez reagent on seni testitud aminohappe aktivaatoritest tõhusaim asaVal-i *N*-terminaalile järgmise aminohappe lisamiseks.

Märksõnad: asa-peptiid, asa-peptiidisüntees, asa-valiin, Ghosez reagent, TCFH, SPPS

Orgaaniline keemia – P390

Synthesis of aza-valine containing aza-peptides

Peptidomimetics, such as aza-peptides, are modified peptides designed to enhance their properties and thereby be better candidates for drug development. However, the synthesis of aza-peptides has its challenges, because traditional activators used in solid phase peptide synthesis (SPPS) often do not obtain good enough yields. The formation of aza-peptide bond is the most crucial part of the synthesis and is substantially affected by the steric effect of the amino acid side group. To increase the yield of aza-peptides, it is necessary to find suitable activators and develop reasonable synthesis methods.

The aim of this research was to examine the efficiency of the activators TCFH and Ghosez reagent in the synthesis of aza-peptide bond with the sterically most hindered aza-amino acid, aza-valine (azVal). At first the activators were tested in model peptides H-Ala-azVal-Phe-NH₂ and H-Ser-azVal-Phe-NH₂. Then the synthesis of PKA minimum substrate RRASVA aza-analogue RRASazVA, was synthesized. The Ghosez reagent was found to be the most efficient amino acid activators tested so far for the next amino acid coupling to the *N*-terminus of asaVal.

Keywords: aza-peptide, aza-peptide synthesis, aza-valine, Ghosez reagent, TCFH, SPPS

Organic chemistry – P390

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Peptiidid ja asa-peptiidid.....	8
1.2 Peptiidide süntees.....	9
1.3 Asa-aminohapete prekursorite süntees.....	11
1.4 Peptiidsideme moodustumine.....	12
1.5 Asa-peptiidide süntees.....	13
2. REAGENTIDE ja APARATUURI KIRJELDUS.....	17
2.1 Kasutatud reaktiivid ja solvendid.....	17
2.2 Aparatuur ja töövahendid.....	18
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
3.1 Asa-valiini prekursori süntees [30].....	19
3.1.1 Fmoc-hüdrasiini süntees.....	19
3.1.2 9H-fluoreen-9-üülmetüül-2-(1-metüületülideen)hüdrasoonkarboksülaadi süntees.....	19
3.1.3 9H-fluoreen-9-üülmetüül-2-(1-metüületülideen)hüdrasiinkarboksülaadi süntees.....	19
3.2 Mudelpeptiidide H-Ala-asaVal-Phe-NH ₂ ja H-Ser-asaVal-Phe-NH ₂ süntees.....	20
3.2.1 Esimese aminohappe (Phe või Ala) sidumine vaigu külge [5].....	20
3.2.2 AsaVal prekursori sidumine tahkele kandjale.....	20
3.2.3 Fmoc-Cl sidumine H-Phe-NH-vaigu külge [4].....	20
3.2.4 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt.....	21
3.2.5 Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga TCFH [6].....	21
3.2.6 Asa-peptiidsideme moodustumine Ghosez reagentiga [6].....	21
3.2.7 Asa-peptiidsideme moodustumise kineetilised mõõtmised.....	22
3.3 RRASasaVA süntees.....	22
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	24
4.1 AsaVal prekursori süntees.....	24
4.2 Fmoc-asaVal-Phe-NH-vaik süntees.....	24
4.3 Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH ₂ süntees aktivaatoriga TCFH.....	25
4.4 H-Ala-asaVal-Phe-NH ₂ süntees Ghosez reagentiga.....	26
4.5 H-Ser-asaVal-Phe-NH ₂ süntees Ghosez reagentiga.....	27

4.6 Proteiinkinaas A miinimumsubstraat RRASasaVA süntees.....	28
KOKKUVÕTE.....	30
SUMMARY.....	31
KASUTATUD KIRJANDUS.....	32
TÄNUAVALDUS.....	35
LISAD.....	36

KASUTATUD LÜHENDID

Lühend	Inglisekeelne nimetus	Täispikk nimetus
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitriil
Ala, A	<i>Alanine</i>	Alaniin
Arg, R	<i>Arginine</i>	Arginiin
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>	Nõrgendatud täielik sisepeegeldus
BTC	<i>Bis(trichloromethyl)carbonate</i>	Bis(triklorometüül)karbonaat/trifosgeen
COMU	<i>1-((1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)-dimethylamino-morpholinomethylene))methanaminium hexafluorophosphate</i>	1-((1-(Tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülideenaminooksü)-dimetüülamino-morfolinometüleen))metaanamiinium heksafluorofosfaat
DCM	<i>Dichloromethane</i>	Diklorometaan
DMA	<i>Dimethylacetamide</i>	Dimetüülatsetaamid
DMF	<i>N,N-Dimethylformamide</i>	Dimetüülformamiid
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>	Elektropihustusionisatsioon
Et ₂ O	<i>Diethyl ether</i>	Dietüüleeter
EtOAc	<i>Ethyl Acetate</i>	Etüülatsetaat
Fmoc	<i>Fluorenylmethoxycarbonyl</i>	Fluorenüülmetoksükarbonüül
Gly, G	<i>Glycine</i>	Glütsiin
HBTU	<i>2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate</i>	2-(1H-Bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüülooroonium heksafluorofosfate
HOBt	<i>1-Hydroxybenzotriazole</i>	1-Hüdoksübensotrisool
Ile, I	<i>Isoleucine</i>	Isoleutsiin
IP	<i>Infrared spectroscopy</i>	Infrapuna spektroskoopia
LCMS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>	Vedelikkromatograafia-massispektromeetria
Leu, L	<i>Leucine</i>	Leutsiin

LPPS	<i>Liquid-phase peptide synthesis</i>	Vedelfaasiline peptiidisüntees
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanool
NMI	<i>N-Methylimidazole</i>	<i>N</i> -metüülimidasool
NMP	<i>N-Methylpyrrolidone</i>	<i>N</i> -metüülpürrolidoon
Phe, F	<i>Phenylalanine</i>	Fenüülalaniin
PK	<i>Protein kinase</i>	Proteiinkinaas
PyOxim	<i>O- ((Cyano(ethoxycarbonyl)methyliden)-amino)-yloxytri(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate</i>	<i>O- ((Tsüano(etoksükarbonüül)metüülideen)-amino)-üüloksütri(pürrolidino) fosfoonium heksafluorofosfaat</i>
Ser, S	<i>Serine</i>	Seriin
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i>	Tahkefaasiline peptiidisüntees
TBTU	<i>O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate</i>	<i>O-(Bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülooronium tetrafluoroboraat</i>
TCFH	<i>Chloro-N,N,N',N'-tetramethylformametiinium hexafluorophosphate</i>	kloro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametüülformamidinium heksafluorofosfaat
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>	Trifluoroetaanhape
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>	Tetrahüdrofuraan
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>	Õhukese kihi kromatograafia
TMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Tuumamagnetresonants
Tyr, Y	<i>Tyrosine</i>	Türosiin
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>	Ultravioletse ja nähtava ala (spektroskoopia)
Val, V	<i>Valine</i>	Valiin

SISSEJUHATUS

Peptiidid on aminohapetest koosnevad biopolümeerid, millel on looduses suur tähtsus nii organismi ehituskividenä kui ka biokeemiliste protsesside reguleerijatenä. Kõrge bio-spetsiifilisuse tõttu kasutatakse neid laialdaselt kliinilistel eesmärkidel. Oma olulisusest hoolimata on neil ka puudusi, mis raskendavad nende kasutust ravimikandidatenä. Peptiidid lagunevad ensüümide mõjul elusorganismis kiiresti ning selle vältimiseks modifitseeritakse nende struktuuri samal ajal säilitades originaalpeptiidile vastavad bioaktiivsed omadused, et võimaldada neid laiemalt rakendada ravimites [1,2].

Üks grupp peptiidi struktuurseid analooge, peptidomimeetikuid, on asa-peptiidid, mille erinevus seisneb peptiidiahelas vähemalt ühe α -süsiniku asendamisel lämmastikuga. Selle erinevuse tulemusena muutub vastava aminohappe geomeetria ning seetõttu ka bioloogilised omadused. Nende omadusi on keeruline uurida [3], sest hetkel ei ole asa-peptiidide sünteesimiseks rahuldavat meetodikat. Nende sünteesimine vajab lisaks asa-aminohappe prekursoreid, mis ei ole stabiilsed ega kommertsiaalselt kättesaadavad. Selleks tuleb need esmalt valmistada kaitserühmaga varustatud hüdrasiinidest. Asa-peptiidide sünteesi juures on kõige kriitilisemaks etapiks asa-aminohappele järgmise aminohappe lisamine, mis sõltub suuresti nii asa-aminohappe külghela kui ka selle *N*-terminaalile lisatava aminohappe steeriliselt mahukusest [3,4], samuti lisatava aminohappe aktivaatorist [3,5]. Samal põhjusel ei sobi asa-peptiidide valmistamiseks traditsioonilises tahkefaasi meetodis (SPPS) kasutatavad aktivaatorid.

Käesoleva töö eesmärk on SPPS meetodil sünteesida ja puhastada proteiinkinaas (PKA) miinimumsubstraat RRASVA asa-analoog RRASasaVA, mis sisaldab steeriliselt takistatud külgrühmaga asa-valiini (asaVal). Asa-peptiidsideme moodustamiseks võimalikult kõrgete saagistega teostatakse esmalt kineetilised mõõtmised mudelpeptiidides H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ ja H-Ser-asaVal-Phe-NH₂. Selle eesmärk on ajas jälgida tekkiva tripeptiidi ja väheneva dipeptiidi omavahelist suhet, mis annab infot aktivaatorite efektiivsuse kohta. Lisatava aminohappe aktivaatoritena testitakse TCFH-d (*N,N,N',N'*-tetrametüülkloroformamidiinium-heksafluorofosfaat) [6] ja Ghosez reagenti (1-kloro-*N,N*-2-trimetüül-1-propenüülamiin) [7], mis on hiljutistes uuringutes osutunud efektiivseimateks aktivaatoriteks asaVal-i *N*-terminaalile aminohappe türosiini sidumiseks [6].

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

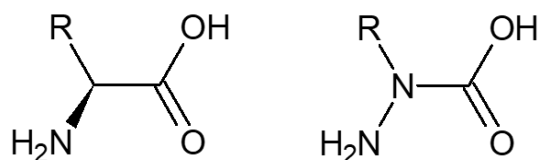
1.1 Peptiidid ja asa-peptiidid

Peptiidid koosnevad aminohappejääkidest, mis on omavahel ühendatud amiid- ehk peptiidsidemega. Peptiidid on laialdaselt kasutusel ravimitööstuses [8–11], kuid probleemseks võib olla nende madal metaboolne stabiilsus elusorganismis ja bioloogiline adsorptsioon [12]. Peptiidipõhiste ravimite väljatöötamisel kasutatakse nende bioaktiivsete omaduste parandamiseks peptidomimeetikuid [1,13].

Peptidomimeetikud jäljendavad looduslikke peptiide ning nende põhieesmärk on interakteeruda biomolekulidega ning luua algsele peptiidile vastav bio-spetsiifiline toime. Peptidomimeetikud võivad võrreldes algse peptiidiga olla tsüklilised, neile võib olla lisatud sünteetilisi aminohappeid või modifitseeritakse nende sekundaarstruktuuri. [1]

Üks peptidomimeetikute näide on asa-peptiidid, mis on peptiidide analoogid, kus ühes või mitmes aminohappejäägis on α -süsinik asendatud lämmastiku aatomiga [14]. Selle struktuurilise erinevuse tõttu ei ole molekul enam vastava asendi juures kiraalne ja geomeetria muutub tetraeedrilisest trigonaalseks, seetõttu väheneb karbonüülrühma elektrofiilsus (Skeem 1) [1,15,16].

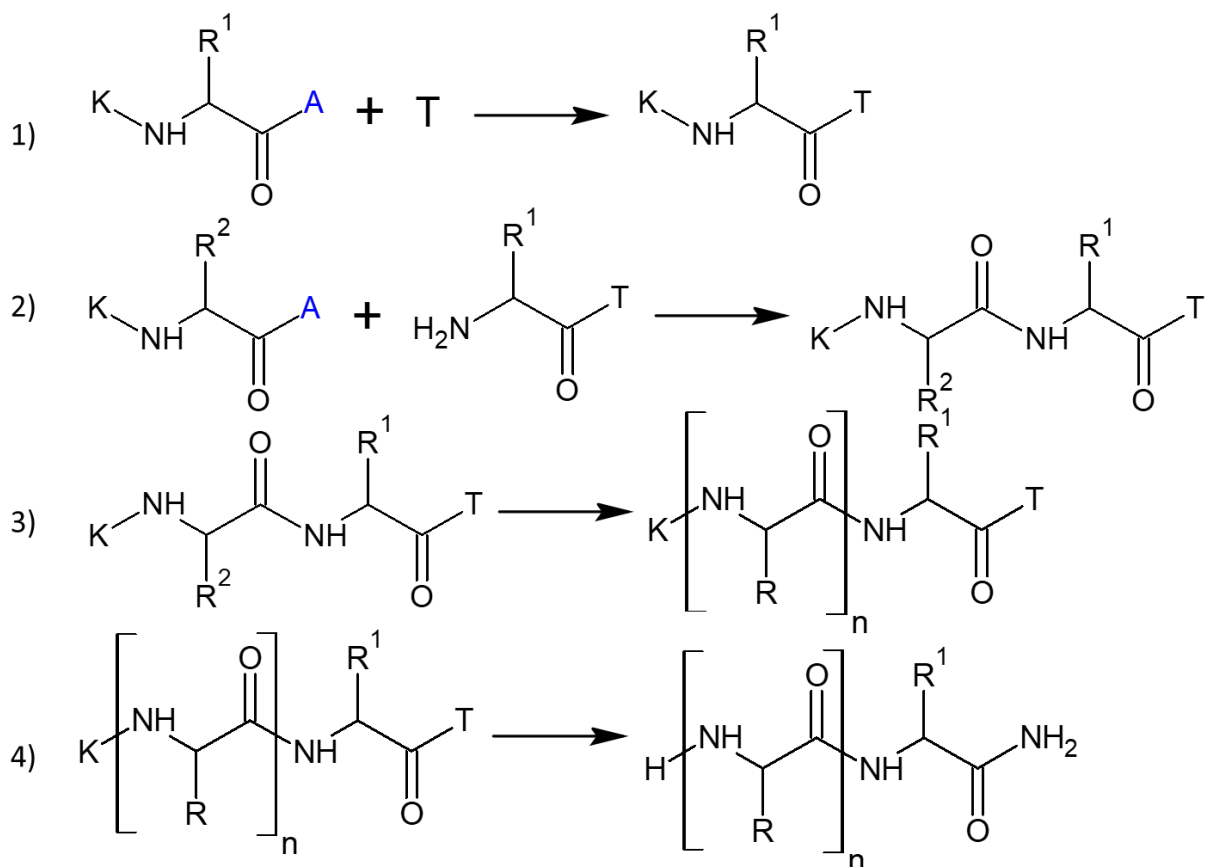
Asa-peptiidid on elusorganismis vastupidavamad ning neid kasutatakse peamiselt peptiidsete ravimite stabiilsuse parandamiseks ensümaatilise degradatsiooni vastu [12,17,18]. Asa-peptiide on kasutatud proteaaside inhibiitoritena ning mitmete retseptorite agonistide ja antagonistidena [19], näiteks A-viirushepatiidi 3C [20] ja HIV proteaasi inhibiitorina [16,19,21,22]. Kliiniliselt testitud ja FDA (USA Toidu- ja Raviamet) poolt heakskiidu saanud asa-peptiide sisaldavad ravimid on näiteks vähiravis kasutatav Goserelin [1] ja HIV-nakkuse puhul kasutatav Atazanavir [2]. Lisaks on arendamisel uut tüüpi tsüklilisi asa-peptiide, mis võimaldaksid varasemat Alzheimeri tõve diagnostikat ja ravi [23].



Skeem 1. Aminohape ja asa-aminohape. R on (asa-)aminohappe külghel.

1.2 Peptiidide süntees

Peptiidide sünteesis on kõige levinumaks meetodiks tahkefaasi peptiidi süntees (SPPS), mida tuntakse ka Merrifield'i meetodina (Skeem 2) [24]. Selle meetodi eelis on võimalus pesta välja lahusesse jäänud reageerimata jäänud lähteaineid ja reaktsiooni käigus tekkinud kõrvalprodukte. Meetodi puudus on suurte solvendihulkade kasutamine ning vastavaid solvente, milleks on DCM (diklorometaan), DMF (*N,N*-dimetüülformamiid), NMP (*N*-metüülpürrolidoon) ja DMA (dimetüülsetamiid), ei peeta keskkonnasõbralikeks [25]. Lisaks kasutatakse maksimaalsete saagiste saamiseks reagentide ülehulkasid. Süntees viiakse üldiselt läbi filtriga varustatud kolonnis. Esimene aminohape kinnitatakse enamasti *C*-terminaali kaudu tahkele kandjale, milleks on reaktsioonikeskkonnas (ja kõikides reaktsioonides kasutatavates solventides) lahustumatu polümeer. Nukleofiilsete omadustega aminorühm on reaktsioonivõimeline ning soovimatute reaktsioonide vältimiseks on aminohappe *N*-terminaalis ajutine kaitserühm. Osade aminohapete puhul tuleb püsivalt kaitsta ka külghelas olevad funktsionaalrühmad. Peamiselt kasutatakse ajutise kaitserühmana Fmoc-kaitserühma, mida saab selektiivselt eemaldada aluselistes tingimustes järgmise aminohappe lisamiseks peptiidahelasse [24]. Külghelates asuvad kaitserühmad, nagu näiteks Boc (tert-butoksükarbonüül), Trt (tritüül) ja Pbf (2,2,4,6,7-pentametüüldihüdrosobensofuraan-5-sulfonüül) eemaldatakse koos peptiidi eemaldamisel tahkelt kandjalt, mida tehakse tugevalt happelises keskkonnas, enamasti TFA (trifluoroetaanhape) lahuses [25]. Merrifield'i meetodit saab ka kasutada *asa*-peptiidide sünteesimiseks, kuid erinevus tuleb sisse *asa*-aminohappe sidumisel peptiidi ahelasse ja sellele järgneva aminohappe sidumisel.



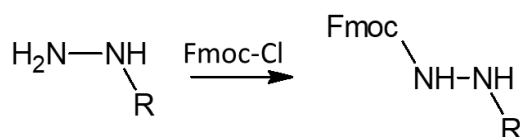
Skeem 2. Tahkefaasi peptiidi süntees etapiviisiliselt. R^1 ja R^2 on aminohappejääkide külghelad, A on aminohapet aktiveeriv rühm, K on ajutine kaitserühm ning T on tahke kandja. 1. etapis kinnitatakse aktiveeritud C-terminaaliga aminohape tahke kandja külge; 2. etapis seotakse aktiveeritud aminohape tahke kandja küljes olevale aminohappele, millelt on eelnevalt eemaldatud ajutine kaitserühm; 3. etapis korratakse aminohapete sidumist tahkele kandjale kuni on sünteesitud soovitud järjestus; 4. etapis toimub kaitserühmade (ka külghela) eemaldamine ning peptiid eemaldatakse tahkelt kandjalt. [24]

Peptiidsünteesis kasutatakse ka vedelfaasi sünteesi (LPPS), kus esterdatakse esimese aminohappe C-terminaal [26]. Kogu reaktsioon toimub lahuse keskkonnas ning peptiidiahel on kinnitatud reaktsiooni keskkonnas lahustuvale molekulile (ingl *tag*) või väikesemahulisele polümeerile. Meetodi eeliseks on märgatavalt väiksem solvendikulu, mis on oluline keskkonnateemade kontekstis. LPPS-i puhul pole vaja kasutada nii suurt reagentide liiga kui SPPS-i puhul. Meetodi suurim puudus on vaheühendite puhastamine pärast igat aminohappe sidumisetappi. Vedelfaasi sünteesi ei saa läbi viia ka suurte ainekogustega ning pikkade peptiidijärjestuste sünteesimiseks [27].

1.3 Asa-aminohapete prekursorite süntees

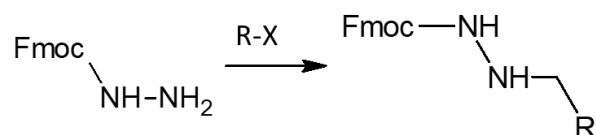
Asa-aminohapete korral on tegemist aminohapete analoogidega, mis ei ole stabiilsed ühendid, sest need dekarboksüleeruvad kiiresti [3]. Sellel põhjusel sünteesitakse asa-peptiide kombineerides hüdrasiini- ja peptiidikeemiat [3,28]. Asa-peptiidide sünteesimiseks kasutatakse vastava aminohappe asa-analooge, mida nimetatakse asa-aminohappe prekursoriteks, ning selleks on monokaitstud hüdrasiini derivaadid [29,30]. Enamik prekursoreid ei ole kommertsiaalselt kättesaadavad, seega tuleb neid ise sünteesida. Levinumaid meetodeid prekursorite sünteesimiseks on alküülitud hüdrasiini kaitsmine kaitserühmaga (Skeem 3), hüdrasiini otsene alküülimine (Skeem 4) ja hüdrasiini redutseeriv alküülimine (Skeem 5) [3,30].

1) Alküülitud hüdrasiini kaitsmisel kaitserühmaga peab kommertsiaalselt olema kättesaadav monoalküülhüdrasiin, mille külgrühm vastab valmistatavale aminohappele. Edasi seotakse kaitserühm alküülimata lämmastiku külge. Tegemist ei ole selektiivse etapiga, sest hüdrasiini küljes olev alküülrühm mõjutab mõlema lämmastiku nukleofiilsust. Seetõttu saadakse alküülitud hüdrasiini kaitsmise reaktsiooni puhul produktide segu, kus kaitserühm võib olla seotud nii primaarse kui ka sekundaarse lämmastikuga. Reaktsiooni selektiivsuse parandamiseks on võimalik selektiivselt kaitsta eelnevalt primaarne lämmastik, siis siduda Fmoc-kaitserühm sekundaarsele lämmastikule ning seejärel tuleks eemaldada selektiivselt esimesena seotud kaitserühm. [31]



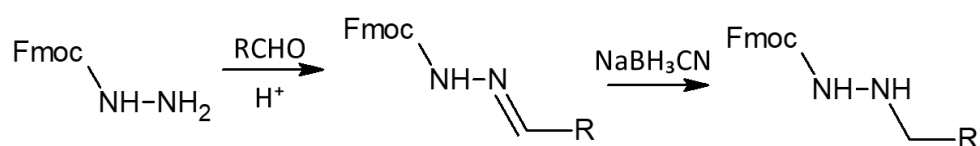
Skeem 3. Alküülitud hüdrasiini kaitsmine Fmoc-kaitserühmaga. R on vastava aminohappe külghel. [31]

2) Hüdrasiini otsesel reageerimisel alustatakse monokaitstud hüdrasiini sünteesist. Edasi tuleb kaitsmata lämmastiku külge siduda vastav alküülrühm. Selle etapi kitsaskohaks on monoalküülitud ühendi suurem reaktsioonivõime võrreldes monokaitstud hüdrasiiniga. Ühendi monoalküülitud lämmastiku nukleofiilsus kasvab ning see võib anda reaktsioonisegusse ka di- ja trialküülhüdrasiini. Probleemi vältimiseks kasutatakse reaktsiooni läbiviimiseks monokaitstud hüdrasiini ülehulkasid. [32]



Skeem 4. Hüdrasiini otsene redutseerimine. R on vastava aminohappe külghel ja X on halogeen (Cl, Br või I). [3]

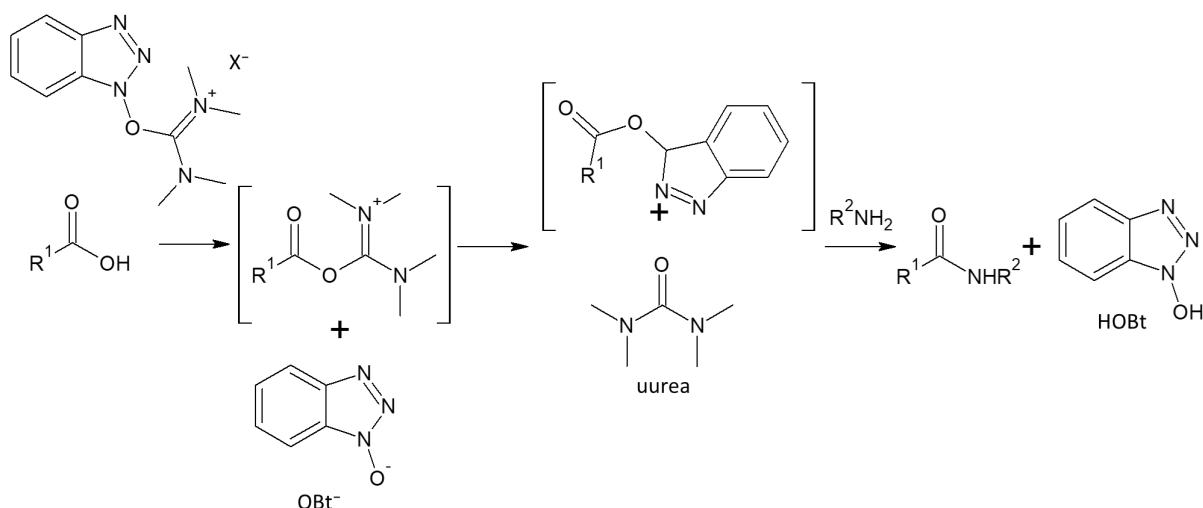
3) Hüdrasiini redutseerival alküülimisel tuleb esmalt sünteesida monokaitstud hüdrasiin. Vaheühendina tekkiv hüdrasoon ei ole eriti stabiilne ühend ning see redutseeritakse happelises keskkonnas NaNH_3CN -ga, mis on küllaltki kiire ning selektiivne etapp. [33]



Skeem 5. Hüdrasiini redutseeriv alküülimine. R on vastava aminohappe külghel. [3]

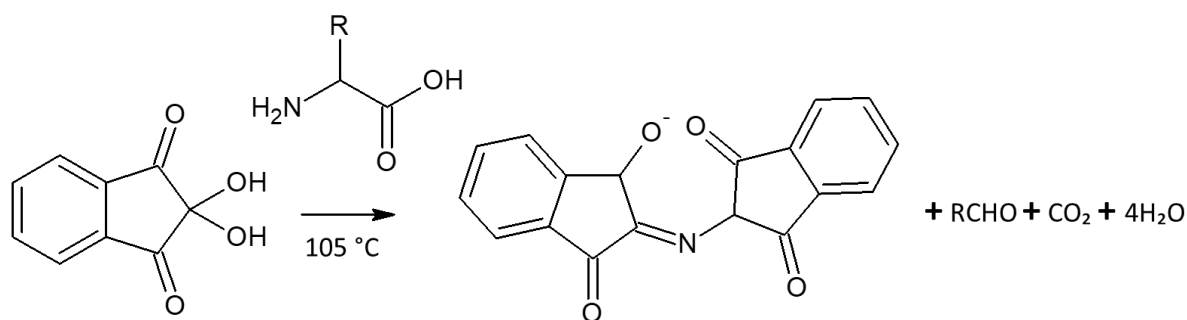
1.4 Peptiidsideme moodustumine

Peptiidides on aminohappejäägid omavahel seotud peptiidsidemega, mis tekib aminohapete amino- ja karboksüülrühma reageerimisel [34]. Peptiidsideme moodustumiseks toatemperatuuril ja ilma soovimatute kõrvalproduktideta, kasutatakse peptiidsünteesil aminohappe aktivaatoreid, vastasel korral oleks reaktsiooniproduktiks ammooniumsool. Enamlevinud on näiteks amiiniumpõhiseid aktivaatoreid, nagu HBTU (2-(1H-bensotriasool-1-üül)-1,1,3,3-tetrametüüluuroonium heksafluorofosfaat) ja TBTU (*O*-(bensotriasool-1-üül)-*N,N,N',N'*-tetrametüüluuroonium tetrafluoroboraat), mis muudavad lisatava aminohappe *C*-terminaali vastavaks bensotriasoolistriks (Skeem 6) [35]. Vastavaid aktivaatoreid kasutatakse üldiselt koos bensotriasoolrühma sisaldavate lisanditega, nagu näiteks HOBt (1-hüdroksübensotrisool), mille eesmärk on vältida reaktsiooni käigus ratsemisatsiooni. Aktivaatorite kasutamisel tuleb lisatava aminohappe eelaktivatsioon läbi viia enne kui see lisatakse tahkele kandjale [36].



Skeem 6. Peptiidsideme moodustumine aktiveerides lisatava aminohappe karboksüülrühma kasutades HBTU-d/TBTU-d. X on PF_6 (HBTU) või BF_4 (TBTU), R^1 on lisatava aminohappe külghel ja R^2 on eelnev peptiidijärjestus.

Peptiidsideme tekkimise kiireks kvalitatiivseks kontrolliks tehakse pärast aminohappe sidumisetappi Kaiseri ehk ninhüdrini test (Skeem 7). Ninhüdrin reageerib vabade/kaitsemata NH_2 -rühmadega, $\sim 105^\circ\text{C}$ juures muutub selle lahus tumesiniseks. Kui peptiidil vabad aminorühmad puuduvad, jääb lahus oma algset värvi ehk kollaseks. Sellisel juhul on teada, et sidumisreaktsioon oli edukas. [37]

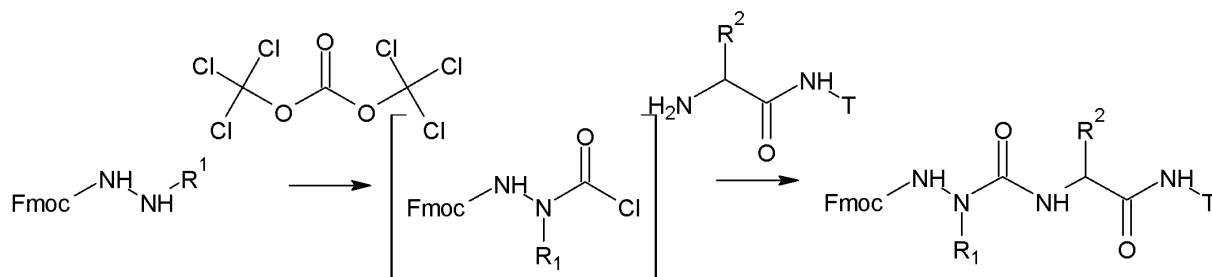


Skeem 7. Ninhüdrini seondumine aminohappe vaba *N*-terminaaliga. R on aminohappe külghel. [37]

1.5 Asa-peptiidide süntees

Võrreldes loodusliku aminohappega on asa-aminohappe *N*-terminaal vähenenud nukleofiilsusega ja selle tõttu on asa-aminohappeid raskem lisada peptiidijärjestusse [5,29,38]. Asa-peptiidide sünteesis aktiveeritakse kõigepealt asa-aminohappe prekursor ja seotakse tahke kandja külge kinnitatud peptiidiahela *N*-terminaalile [29,30]. Hüdrasiinne

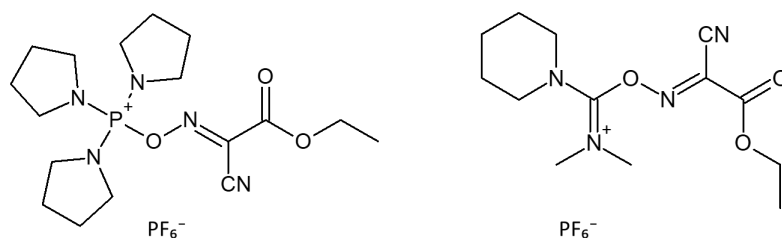
prekursor aktiveeritakse karbonüülrühma doonoritega, nagu fosgeen [30] ja tema derivaat bis(triklorometüül)karbonaat ehk trifosgeen (BTC) (Skeem 8) [3,30,39–41]. Üldiselt eelistatakse aktivaatorina kasutada toatemperatuuril tahket BTC-d, sest fosgeen ise on väga mürgine gaas ning seda on keeruline doseerida. Lisaks on BTC-l säilinud fosgeeniga võrreldav reaktsioonivõime [39,42].



Skeem 8. Fmoc-kaitstud asa-aminohappe prekursori aktiveerimine BTC-ga ja kinnitamine peptiidiahelasse. R^1 ja R^2 on aminohappejääkide külghelad ning T on tahke kandja. [43]

Kui eelnev etapp kulgeb enamasti edukalt sõltumata asa-aminohappe ja sellele eelneva aminohappe struktuurist [41], siis asa-peptiidi sünteesis on kõige kriitilisem etapp asa-aminohappejäägi *N*-terminaalile järgmise aminohappe sidumine. Nagu eelnevalt sai mainitud, on asa-aminohappe jäägis amino-rühma lämmastiku aatom väiksema nukleofiilsusega kui aminohappe jäägi lämmastik. Asa-peptiidsideme moodustamiseks kulub võrreldes peptiidsidemega rohkem aega, isegi kõrgete reaktsiooni saagiste korral. Selle etapi saagist mõjutavaid tegureid on mitmeid: lisatava aminohappe aktivaatorite struktuur, peptiidiahelas oleva asa-aminohappe ning ka lisatava aminohappe külgrühmade steeriline takistus [3].

Meie uurimisgrupis arendatakse asa-peptiidide sünteesimeetodeid ja muuhulgas on testitud aktivaatorite mõju asa-peptiidsideme moodustamise efektiivsusele. Kineetiliste mõõtmiste läbiviimisel selgus, et asa-peptiidsideme moodustumine on ligi 30 korda aeglasem võrreldes peptiidsidemega ka kõige tõhusamate aktivaatorite korral. Eksperimendis katsetatud aktivaatorid leiavad kasutust ka traditsioonilises peptiidsünteesis ning oksümal põhinevad aktivaatorid PyOxim (O-((tsüano(etoksükarbonüül)metüül)ideen)-amino)-üüloksütri(pürrolidino) fosfoonium heksafluorofosfaat) ja COMU (1-((1-(tsüano-2-etoksü-2-oksoetüül)ideenamino)oksü)-dimetüülamino-morfolinometüleen) metaanamiinium heksafluorofosfaat) (Skeem 9) andsid väga häid tulemusi ka asa-peptiidsideme tekkimisel mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH₂. [5]

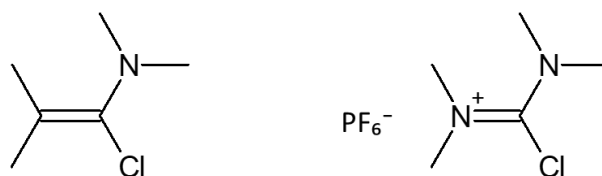


Skeem 9. Aktivaatorite PyOxim (vasakul) ja COMU (paremal) struktuurid.

Asa-peptiidsideme moodustumise efektiivsus on mõjutatud ka lisatava aminohappe külghela steerilisest takistusest. Meie uurimisgrupis aktiveeriti COMU-ga erinevaid aminohappeid ning lisati need dipeptiidile H-asaAla-Phe-NH₂-vaik. Tripeptiidi tekkimise reaktsiooni kiirus oli seda väiksem, mida suurem oli lisatava aminohappe steerilist mõju kirjeldav konstandi väärtus [44]. Asa-peptiidsideme moodustumise uurimisel mudelpeptiidides H-Gly-asaAla-Phe-NH₂ ja H-Val-asaAla-Phe-NH₂ täheldati, et Gly ja Val liitumisel asaAla-le on reaktsioonide kiiruskonstandid vastavalt $k_{\text{obs}} = 0,0330 \text{ min}^{-1}$ ja $k_{\text{obs}} = 0,0018 \text{ min}^{-1}$, mis näitab et reaktsioon Val-ga on ligi 18 korda aeglasem võrreldes Gly-ga. Samas kulgesid ka steeriliselt kõige enam takistatud külgrühmadega Val ja Ile reaktsioonid asaAla N-terminaaliga pikema aja jooksul praktiliselt lõpuni [45].

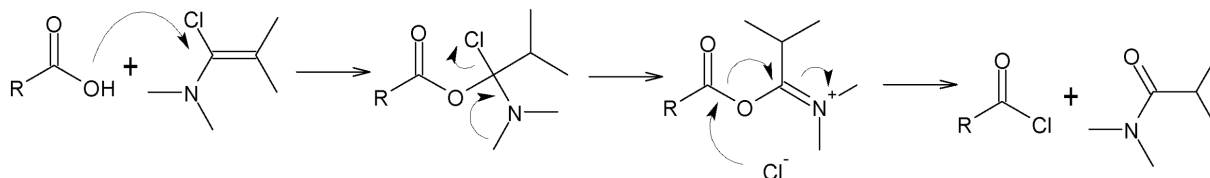
Suuremat mõju avaldab aga peptiidijärjestuses oleva asa-aminohappe külgrühma steeriline mahukus, mida meie teadusgrupis on uuritud moodustades asa-peptiidsidet Ala ja erinevate asa-aminohapete (asaAH: asaGly, asaAla, asaLeu, asaVal) vahel mudelpeptiidis H-Ala-asaAH-Phe-NH₂. Kineetiliste mõõtmiste teostamiseks aktiveeriti lisatav aminohape (Ala) COMU-ga ning jälgiti HPLC-MS meetodil tripeptiidi tekkimist ajas. Tulemustest selgus, et suurema steerilise takistusega külgrühma omavad asa-aminohapped moodustavad kehvemini asa-peptiidsidet. Lisaks selgus, et aktivaator COMU ei sobi lisatava aminohappe aktiveerimiseks, kui peptiidijärjestuses on sellele eelnevaks asa-aminohappeks asaVal. Seega asa-aminohapet asaVal sisaldavad peptiidijärjestused vajavad selle etapi teostamiseks efektiivsemat aktivaatorit. [4]

Hiljutistest teadusuuringutest selgub, et asaVal-le järgmise aminohappe sidumiseks sobivad komertsiaalsetest aktivaatoritest kõige paremini Ghosez reagent ning TCFH (Skeem 10). [6]

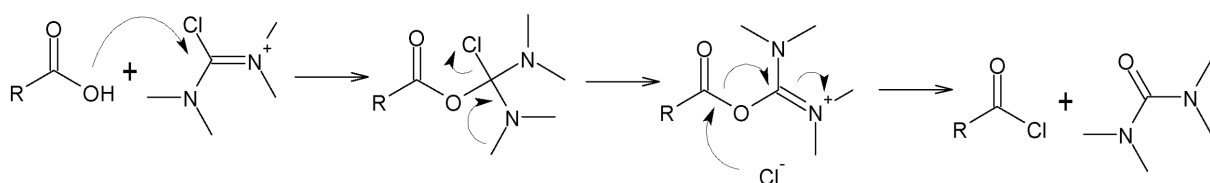


Skeem 10. Aktivaatorite Ghosez reagenti (vasakul) ja TCFH (paremal) struktuurid.

Uuringud Ghosez reagenti ja TCFH-ga näitavad asa-peptiidsideme moodustamise efektiivsust Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH ja asaVal-i vahel vastavalt 67% ja 89% ulatuses ning meie teadusgrupis tehtud eelkatsed mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-NH₂, kus Ala sidumiseks asaVal-le kasutati Ghosez reagenti, on nende tulemustega kooskõlas. Mõlemad aktivaatorid on küllaltki sarnase struktuuriga ning seda on ka aminohappe aktiveerimistingimused ja reaktsioonimehhanismid (Skeem 11-12). TCFH puhul on tegemist küllaltki uue aktivaatoriga, mille korral on kahtlustatud ka võimalikku epimerisatsiooni toimumist asa-peptiidsideme moodustamisel, kui kasutada alusena NMI-d (*N*-metüülimidasool) [6]. Seega TCFH kasutamismetoodika vajab kindlasti arendamist, varieerides nii sünteesi käigus lisatavat alust kui ka võimalikke lisandeid kõrvalreaktsioonide vältimiseks [46].



Skeem 11. Aminohappe aktiveerimine Ghosez reagentiga. [7]



Skeem 12. Aminohappe aktiveerimine TCFH-ga. [46]

2. REAGENTIDE JA APARATUURI KIRJELDUS

2.1 Kasutatud reaktiivid ja solvendid

Nimetus	M (g/mol)	Puhtus (%)	Tootja
AsaVal prekursor	296,36	93	Antud töös sünteesitud
Atsetonitriil	41,05	≥99,9	Sigma-Aldrich
Atsetoon	58,08	≥99,9	Sigma-Aldrich
BTC	296,75	-	Merck
DCM	84,93	≥99,8	Sigma-Aldrich
Dietüüleeter	74,12	≥99,9	Sigma-Aldrich
DIPEA	129,24	≥99	Sigma-Aldrich
DMF	73,09	99,8	Sigma-Aldrich
Etaanhape	60,05	≥99	Merck
Etanool	46,07	96	Moe Piiritusetehas
Etüülatsetaat	88,11	≥99,8	Sigma-Aldrich
Fenool	94,11	99,8	Lachner
Fmoc-Cl	258,7	97	Novabiochem
Fmoc-L-Ala-OH*H ₂ O	329,33	-	Iris Biotech GmbH
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648,77	≥99,8	Sigma-Aldrich
Fmoc-L-Phe-OH	387,43	-	Iris Biotech GmbH
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	383,44	-	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Rink-Amiid-MBHA vaik	-	-	Novabiochem
Ghosez reagent	133,62	>98,5	Acros Organics
HBTU	379,24	≥98	Novabiochem
Heksaan	86,18	≥97,0	Honeywell
HOBt	135,12	≥97	Sigma-Aldrich
Hüdrasiinhüdraat (80% vesilahus)	32,0	-	Fisher Scientific
K ₂ CO ₃	135,21	-	Keemiakaubandus AS
KCN	65,12	-	Chemapol
NaBH ₃ CN	62,84	95	Sigma-Aldrich
NaHCO ₃	84,01	-	Keemiakaubandus AS
Ninhüdriin	178,14	≥99	Sigma-Aldrich
Petrooleeter	82,20	≥95	Sigma-Aldrich
Piperidiin	85,15	≥99	Sigma-Aldrich

TBTU	321,09	≥99,5	Iris Biotech GmbH
TCFH	280,58	≥ 98	Luxembourg Bio Technologies
TFA	114,02	≥99,5	IrisBiotech GmbH
THF	72,11	≥99,9	Merck
TIS	158,36	98	Sigma-Aldrich
Tolueen	92,14	≥99,8	Sigma-Aldrich

2.2 Aparatuur ja töövahendid

HPLC-MS analüüsid tehti Shimadzu LCMS-2020 kromatograafia, 220/254 nm lainepikkusel, kasutades UV-Vis ja massidetektorit. Seade oli varustatud kolonniga Phenomenex Kinetex 5 µm EVO (C18, 100 Å, 250 × 4,6 mm). Massispektri mõõtmise toimus positiivse ionisatsiooni mõõtmisrežiimis, kus oli ionisatsiooniallikaks ESI.

RRASaVA puhastati Shimadzu HPLC-20AD kromatograafia, 220 nm lainepikkusel, kolonniks oli Phenomenex Luna 5 µm (C18, 100 Å, 250 × 15 mm).

IP mõõtmised tehti PerkinElmer Spectrum BX2 Interspektrumi ATR süsteemiga, kus kristalliks oli tsinkseleniid.

TMR mõõtmised tehti Bruker Avance-III 700 MHz ja Bruker Avance-II 200 MHz spektromeetril.

Solvendi eemaldamiseks kasutati Buchi Rotavapor R-210 rotaatoraurustit.

Ainete kuivatamiseks kasutati lüofilisaatorit Christ alpha 1-2 LDplus.

TLC analüüsid tehti 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. Eluendiks oli kasutusel erinevates vahekordades EtOAc, heksaan ja petrooleetriga olenevalt elueeritava aine polaarsusest.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 Asa-valiini prekursori süntees [30]

3.1.1 Fmoc-hüdrasiini süntees

80%-line hüdrasiinhüdraat (15 ekv, 5,763 g) kaaluti viaali ning kanti üle N₂-ga täidetud magnetsegajaga varustatud 1 l ümarkolbi. Kolbi lisati 20 ml 1:1 ACN (atsetonitriil) ja H₂O (dest.) lahust ning segu jahutati jäävannis 0 °C-ni. Fmoc-Cl kaaluti (1 ekv, 3,057 g) ja sellele lisati 150 ml ACN-i. Hüdrasiinile hakati lisama tilkhaaval Fmoc-Cl lahust N₂ keskkonnas 2,5 h jooksul. Lahuse lisamise kiirus tilklehtrist oli kogu aja vältel umbes 1 tilk 2 sekundi kohta. Reaktsiooni toimumise ajal hakkas ümarkolbi tekkima valge suspensioon. Pärast kogu Fmoc-Cl lahuse lisamist eemaldati jäävann ja lasti reaktsioonil käia kuni segu saavutas toatemperatuuri (u 0,5 h). Rotaatoraurustiga eemaldati segust lahusti 38 °C juures. Saadud sademele lisati u 60 ml külma dest. vett ja jäeti segu umbes veerand tunniks jäävanni. Suspensiooni filtriti alarõhul läbi klaasfiltri ning loputati 4 × 15 ml külma dest. veega ja 3 × 15 ml tolueniga. Ainet kuivatati mõned tunnid õhu käes ning siis lüofilisaatoris. Ainele tehti IP analüüs (Lisa 1).

3.1.2 9H-fluoreen-9-üülmetüül-2-(1-metüületülideen)hüdrasoonkarboksülaadi süntees

Fmoc-hüdrasiin (1 ekv, 1,805 g) kaaluti ning sellele lisati 50 ml atsetooni. Suspensioon hapestati paari tilga etaanhappega ning veerand tundi pärast aine lahustumist hakati segu kuumutama keemiseni. Redutseerumisreaktsiooni jälgiti TLC-ga ja ning selle kestus oli 1 h. Pärast reaktsioonisegu jahtumist kontsentreeriti reaktsioonisegu rotaatoraurusti abil 40 °C juures.

3.1.3 9H-fluoreen-9-üülmetüül-2-(1-metüületülideen)hüdrasiinkarboksülaadi süntees

Eelmises punktis sünteesitud toorprodukt lahustati 60 ml THF-s (tetrahüdrofuraanis) ning sellele lisati tilkhaaval etaanhapet (3 ekv, 0,975 ml). Lahus jahutati jäävannis 0 °C-ni ja sellele lisati NaBH₃CN (3 ekv, 1,070 g). Jäävann eemaldati ning reaktsioon käis üleöö. Lahusti eemaldati segust 35 °C juures. Aine lüofiliseeriti pooleks tunniks ja puhastati kolonnkromatograafiliselt, kus eluendiks oli 2:1 EtOAc ja petrooleetri lahus. Produktile tehti IP ja TMR (¹H ja ¹³C) analüüs (Lisad 2-3).

Saagis 93%

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 1,040 (s, 6H, 2×CH₃); 3,192 (s, 1H, CH); 4,218 (t + br s, 2H, J= 7.7 Hz, CH(Fmoc) + NH); 4,498 (s, 2H, CH₂(Fmoc)); 6,159 (br s, 1H, NH) 7,300 (t, 2H,

J1= 7 Hz, Ar(H)); 7,388 (t, 2H, J= 7 Hz, Ar(H)); 7,573 (d, 2H, J= 7 Hz, Ar(H)); 7,750 (d, 2H, J= 7.7 Hz, Ar(H)).

¹³C TMR (700 MHz, CDCl₃, δ): 20,40; 47,25; 51,03; 67,07; 120,05; 125,04; 127,13; 127,87; 141,39; 143,72; 157,26.

3.2 Mudelpeptiidide H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ ja H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ süntees

3.2.1 Esimese aminohappe (Phe või Ala) sidumine vaigu külge [5]

Kaaluti 250 mg Fmoc-Rink-Amiid-MBHA-vaiku (1 ekv, 0,68 mmol/g) filtriga varustatud kolonni ning lasti 20 minutit DCM-is punduda. Edasi lisati 20 minutiks filterkolonni 20% piperidiini lahust DMF-is, et eemaldada vaigult Fmoc-kaitserühm. Reaktsioonisegu jäägid eemaldati pesuga, milles kasutati kahte solventi: DMF ja DCM. Pesti 5 × DMF-ga ja 1 × DCM-ga. Vabade aminorühmade kontrollimiseks tehti ninhüdrüüni ehk Kaiseri test [37] ning TLC analüüs. Kaaluti vaigu suhtes liias Fmoc-L-Phe-OH (3 ekv) ning lahustati DMF-is. Kaaluti aktivaatorid TBTU (3 ekv)/HBTU (3 ekv) ja HOBt (3 ekv) ja kumbki lahustati DMF-is. Aktivaatorite ja lisatava aminohappe lahused segati kokku alusena lisati ka DIPEA (6 ekv). Lahus viidi kolonni ning reaktsioonil lasti toimuda 1 h. Tahket kandjat pesti järgmiseks 3 × DMF-ga, 3 × DCM-ga ja 3 × DMF-ga. Kaiseri testiga kontrolliti reaktsiooni edukust.

3.2.2 AsaVal prekursori sidumine tahkele kandjale

Eelnevalt gaasipõletiga kuumutatud ja N₂ voolus kuivatatud ümarkolbi kaaluti Fmoc-kaitstud asaVal prekursor (200 mg, 4 ekv) ning lahustati see kuivas DCM-is. Kaaluti aktivaator BTC (1,33 ekv), lahustati see kuivas DCM-is. AsaVal prekursori lahusele lisati DIPEA-d (8 ekv) ning pärast reaktsioonisegu jahutamist jäävannis 0 °C-ni, tilkhaaval lisati aktivaatori (BTC) lahus. Aktiveerimisreaktsioonil lasti toatemperatuuril toimuda 30 minutit. Saadud lahus lisati kolonnis olevale vaigule, millelt oli eelnevalt eemaldatud Fmoc-kaitserühm 20% piperidiini lahusega DMF-is, ning reaktsioon jäeti loksutule käima üleöö. Pärast reaktsiooni peatamist tehti jääkide eemaldamiseks pesu 3 × DMF-ga, 3 × DCM-ga, 3 × DMF-ga ja 1 × DCM-ga. Viidi läbi Kaiseri test ning HPLC-MS analüüs kontrollimaks reaktsiooni edukust (Lisad 4-5).

3.2.3 Fmoc-Cl sidumine H-Phe-NH-vaigu külge [4]

Asa-dipeptiidi sünteesi (vt 3.2.2) edukuse hindamiseks HPLC-MS meetodil seoti reageerimata jäänud lähteainele Fmoc-kaitserühm uuesti Phe N-terminaalile, võimaldades ühtlustada HPLC-MS analüüsil lähteaine ja saaduse neeldumisi. Kaaluti vaiku (9,8 mg, 1

ekv) filtriga varustatud süstlasse ning pandi see 10-ks minutiks DCM-i punduma. Kaaluti K_2CO_3 (1 ekv) ja kanti see vaigu juurde. Tahke Fmoc-Cl kaaluti (1 ekv) ja lahustati DCM-is. Lahus kanti süstlasse ning reaktsioonil lasti toimuda 1 h. Reaktsiooni lõpetamiseks pesti vaiku 1 × DCM-ga, 2 × DMF-ga, 2 × H_2O -ga, 2 × DMF-ga ja 2 × DCM-ga. Peptiid eemaldati tahkelt kandjalt (vt 3.2.4).

3.2.4 Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt

Peptiidi tahkelt kandjalt eemaldamiseks lisati sellele tugevalt happelist lahust (95% TFA; 2,5% TIS; 2,5% H_2O) ning reaktsioonil lasti 2 h toimuda. Õhuvoolus aurustati TFA ning peptiid sadestati tsentrifuugimisel dietüüleetriga (Et_2O). Sadet pesti 3 × Et_2O -ga ning Et_2O aurustati õhuvoolus.

3.2.5 Asa-peptiidsideme moodustumine aktivaatoriga TCFH [6]¹

Punktis 3.2.2 sünteesitud peptiid Fmoc-asaVal-Phe-NH-vaik (60 mg, 1 ekv) kaaluti filtriga süstlasse ning pandi 20 minutiks DCM-i punduma. 20% piperidiini lahusega DMF-is eemaldati Fmoc-kaitserühm ning tahkele kandjale tehti pesu 5 × DMF-ga ja 1 × DCM-ga. Dipeptiid kanti kuiva DCM-ga üle tsentrifuugituubi ning termostateeriti 25 °C juures. Kaaluti lisatav aminohape (Fmoc-Ala-OH* H_2O) (10 ekv), lahustati see kuivas DCM-is ning sellele lisati DIPEA (30 ekv). Aktivaator TCFH (10 ekv) lahustati kuivas DCM-is ja jahutati koos lisatava aminohappe lahusega 0 °C-ni. Jahutatud aktivaatori jaalani lahused segati kokku ja lisati tsentrifuugituubis olevale dipeptiidile ning käivitati stopperkell. DCM-i summaarne kogus oli 10 ml.

3.2.6 Asa-peptiidsideme moodustumine Ghosez reagentiga [6]²

Punktis 3.2.2 sünteesitud peptiid Fmoc-asaVal-Phe-NH-vaik (60 mg, 1 ekv) kaaluti, kanti DCM-ga üle filtriga varustatud süstlasse ning pandi 20 minutiks DCM-i punduma. 20% piperidiini lahusega DMF-is eemaldati Fmoc-kaitserühm ning tahkele kandjale tehti pesu 5 × DMF-ga ja 1 × DCM-ga. Vaigule lisati tahkel kujul $NaHCO_3$ (71 ekv). Kaaluti lisatav aminohape (Ala või Ser) (10 ekv) ning lahustati kuivas DCM-is ja jahutati 0 °C-ni. Ghosez reagenti (14 ekv) lisati tilkhaaval jahutatud aminohappe lahusele ning segati 5 minutit. Lahus lisati eelnevalt kuiva DCM-ga tsentrifuugituubi üle kantud asapeptiidi juurde, käivitati stopperkell ning reaktsioonisegust võeti selle toimumise ajal proove. Reaktsioon lõpetati pärast 24 tundi. Reaktsioonisegus oli kokku 10 ml DCM-i.

¹ Tehti muudatusi võrreldes algse meetodikaga: alusena kasutati NMI asemel DIPEA-d.

² Tehti muudatusi reagentide ekvivalentide kasutamisel.

3.2.7 Asa-peptiidside moodustumise kineetilised mõõtmised

Reaktsiooni kineetika jälgimiseks võeti reaktsioonisegust kindlatel ajahetkedel: 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 500 µl proov, mis sisaldas mõningaid vaigu terakesi. See kanti kohe üle filtriga varustatud süstlasse. Edasi tehti reaktsiooni peatamiseks pesu: Ghosez reagenti puhul 2 × DMF-ga, 2 × H₂O-ga, 2 × DMF-ga ja 2 × DCM-ga ning TCFH puhul 2 × DMF-ga, 2 × MeOH-ga ja 2 × DCM-ga. Fmoc-kaitserühma mahavõtmiseks kasutati 20% piperidiini lahust DMF-is ja peptiid eemaldati tahkelt kandjalt punktis 3.2.4 kirjeldatud meetodi järgi. Seejärel tehti peptiidile HPLC-MS analüüs, kus määrati suhe tripeptiidi (produkti) ja dipeptiidi (reageerimata lähteaine) vahel.

Meetodiga määrati reageerimata lähteaine ja produkti suhtelised sisaldused proovis. Produkti moodustumise protsessi on kõige parem kirjeldada kromatogrammi piikide pindalade (S) suhetena. $Y = S(\text{dipeptiid}) / (S(\text{dipeptiid}) + S(\text{tripeptiid}))$

Parameeter Y näitab lähteaine osakaalu reaktsioonisegus. Et reaktsiooni puhul võetialaniini või seriini 10 korda ülehulgas võrreldes vaiguga, on võimalik reaktsiooni kirjeldada esimest järku võrrandiga:

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

Kus k_{obs} on reaktsiooni näiline kiiruskonstant, t on reaktsiooni aeg minutites ja Y_{∞} on platoo väärtus, mis kirjeldab atsüülimisreaktsiooni lõppu. Arvutused tehti GraphPad Prism 5 programmiga.

3.3 RRASasaVA süntees

Vaigu külge seoti punkti 3.2.1 eeskirja järgi Ala kasutades aktivaatoreid HBTU ja HOBt. Punkti 3.2.2 järgi seoti asaVal prekursor ning etapi edukust kontrolliti HPLC-MS analüüsiga (Lisa 6). Seriooni ahelasse lisamiseks kasutati aktivaatorina Ghosez reagenti 4,2 ekv ja alust NaHCO₃ 30 ekv [6]. Muud reaktsioonitingimused vastavad punkti 3.2.6 kirjeldusele. Produkti saagise tõstmiseks, tehti reagentide lisamist kaks korda ning mõlemal juhul tehti sünteesi edukuse kontrolliks HPLC-MS analüüs (Lisad 7-8). Reageerimata jäänud dipeptiidile jäeti enne HPLC-MS analüüsi Fmoc-kaitserühm tagasi sidumata, sest TCFH-ga katsetes selgus, et Fmoc-kaitserühm asaVal-i külge punktis 3.2.3 kirjeldatud meetodikaga ei lähe. Reaktsiooni edukuse hindamiseks jälgiti kromatogrammideelt Fmoc-Ser-asaVal-Ala-NH₂ ja Fmoc-Ser-Ala-NH₂ piikide pindalade vahekordi, millelt tuvastati mõlemal juhul 94% reaktsioonisaagis. Järgmised aminohapped (Ala, Arg) lisati tahke kandja küljes olevale

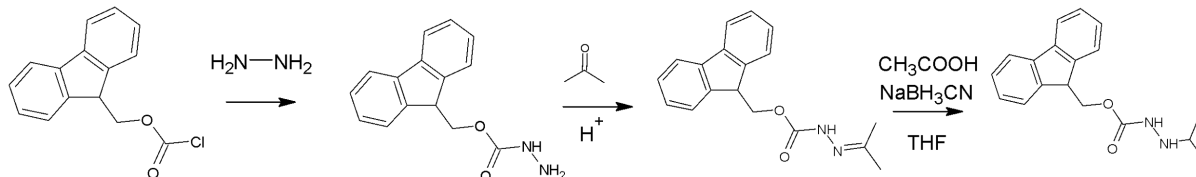
peptiidijärjestuse *N*-terminaalile punktis 3.2.1 kirjeldatud eeskirja järgi. Reaktsioonide edukust kontrolliti Kaiseri testiga. Viimane aminohape (Arg) seoti samamoodi punkti 3.2.1 eeskirja järgi. Kaiseri testiga tuvastati, et reaktsioon ei läinud esimese korraga lõpuni, seega tehti saagise tõstmiseks reagentide teistkordset lisamist. Peptiidijärjestuse kontrollimiseks tehti peptiidile HPLC-MS analüüs (Lisa 9).

Peptiid eemaldati tahkelt kandjalt punktis 3.2.4 kirjeldatud eeskirja järgi, kuid TFA lahuse kogus oli 2 ml/100 mg vaigu kohta. Välja sadestatud peptiidile lisati minimaalne kogus Milli-Q vett kuni peptiidi lahustumiseni ning külmutati -80 °C juures. Seejärel see lüofiliseeriti 24 h ning toorpeptiidile tehti HPLC-MS analüüs (Lisa 10) ja preparatiivne puhastamine vedelikkromatograafilises meetodil. Puhastatud peptiidile tehti HPLC-MS analüüs puhtuse määramiseks (Lisa 11).

4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1 AsaVal prekursori süntees

Käesolevat teadustööd alustati asaVal-i prekursori sünteesimisest, sest asa-aminohappe prekursorid ei ole kommertsiaalselt kättesaadavad. AsaVal prekursori süntees viidi läbi varasemalt väljatöötatud meetodi kohaselt (Skeem 13) [30]. Sünteesi alustati Fmoc-Cl-i ja hüdrasiini vahelisest reaktsioonist, et saada Fmoc-kaitstud hüdrasiin (vt. 3.1.1). Reaktsiooni selektiivsus saavutati reaktsioonisegus tänu liias olevale hüdrasiinile ning madalal temperatuuril Fmoc-Cl tilkhaaval lisamisele. Hüdrasiini jäägi ning tekkinud vesinikkloriidi eemaldamiseks pesti produkti filtreerides seda jääkülma veega. Lisaks tehti pesu toluueniga teiste vähepolaarsete lisandite eemaldamiseks. Sünteesitud Fmoc-hüdrasiini analüüsiti IP meetodil (Lisa 1). Järgmises etapis lahustati Fmoc-hüdrasiin hapestatud atsetoonis ning lahust keedeti 1 h. Sünteesitud hüdrasoonile lisati THF keskkonnas tilkhaaval etaanhapet, mille järel lahus jahutati 0 °C-ni ning sellele lisati hüdrasooni redutseerimiseks NaBH₃CN ja reaktsioonil lasti toimuda üleöö. Pärast lahusti eemaldamist ja aine kolonnkromatograafilist puhastamist analüüsiti prekursorit IP ja TMR meetodil (Lisad 2-3). Antud töös sünteesitud asaVal prekursori saagiseks saadi 93%.

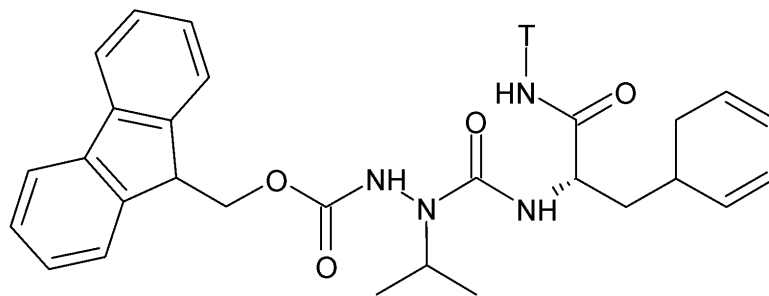


Skeem 13. AsaVal prekursori sünteesiskeem.

4.2 Fmoc-asaVal-Phe-NH-vaik süntees

Pärast asaVal prekursori valmimist hakati sünteesima asa-dipeptiidi mudelühendit (Skeem 14) SPPS meetodil (vt. 1.2). Esmalt seoti tahkele kandjale Phe kasutades aminohappe aktivaatorina vaigu suhtes 3-kordses ülehulgas TBTU/HBTU³ ja HOBt-i ja alusena DIPEA-d. Aminohappe sidumise edukust kontrolliti Kaiseri testiga.

³ Mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ kasutati aktivaatorit TBTU ning H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ korral HBTU-d.



Skeem 14. Fmoc-asaVal-Phe-NH-vaik struktuur. T on tahke kandja ehk vaik.

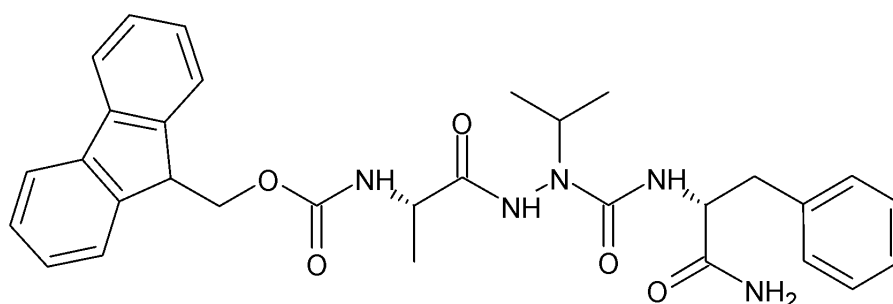
Järgmisena seoti tahkele kandja küljes olevale Phe *N*-terminaalile asaVal prekursor varasemalt välja töötatud meetodil [41], kus kõigepealt kloroatsüüliti asaVal prekursor kõrvalreaktsioonide vältimiseks madalal temperatuuril BTC-ga (Skeem 8) ning lisati vaigu juurde. Sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS analüüsiga (Lisad 4-5). Kogu Phe ära reageerimise hindamiseks seoti lähteainele Fmoc-kaitserühm tagasi (vt. 3.2.3) ja HPLC kromatogrammi piikide pindalade suhete järgi arvutamisel järeldati, et reageerimata Phe-d oli vastavalt 2% ja 11%.

4.3 Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH₂ süntees aktivaatoriga TCFH

AsaVal külge järgmise aminohappe sidumine on keeruline selle steeriliselt mahuka külgrühma tõttu ning seetõttu ei sobi vastava etapi läbi viimiseks tavapäraselt kasutatavad aktivaatorid nagu näiteks COMU [5]. TCFH on küllaltki uus aktivaator, mida on kasutatud edukalt amiidsideme sünteesimiseks [46] ning seda on varasemalt testitud ka asa-peptiidsideme moodustamiseks Tyr ja asaVal vahel [6]. Selles uurimuses testiti veel teisi aktivaatorid Tyr lisamiseks asaVal-ile nagu COMU, BTC, PyBOP (bensotriasool-1-üül-oksü-tris-pürrolidino-fosfooniumheksafluorofosfaat) ja Ghosez reagent, kuid TCFH kasutamisel saadi kõige kõrgem HPLC meetodil määratud reaktsiooni saagis (89%). Samas täheldati selle katse korral võimalikku epimerisatsiooni, kui seda aktivaatorit kasutati koos alusega NMI, ning seetõttu kasutati edasistes uuringutes asa-peptiidsideme moodustamiseks Ghosez reagenti, mis oli võrreldes teiste testitud aktivaatoritega küllaltki efektiivne (HPLC saagis 67%).

Hiljuti pakkus Luxembourg Bio Technologies meie teadusgrupile koostöö võimalust, et testida TCFH-d asa-peptiidsideme moodustamiseks kasutades NMI asemel alusena DIPEA-d. Teise aluse kasutamise eesmärk oli tekitada parema reaktsioonivõimega aktiveeritud aminohape, milleks on aminohappe klooranhüdriid (Skeem 11). Antud töös viidi see

reaktsioon läbi asa-peptiidi mudelühendis Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH-vaik 24 h jooksul 25 °C juures (vt. 3.2.5) meie teadusgrupis välja töötatud kineetilisel meetodil. Reaktsioonisegust võeti proove kindlate ajavahemike tagant ning neid analüüsiti HPLC-MS meetodil. Tekkinud tripeptiidi koguse hindamiseks seoti reageerimata jäänud lähteainele Fmoc-kaitserühm tagasi (vt. 3.2.3), kuid tulemustest selgus, et Fmoc-kaitserühm lähteainele külge ei läinud. 30 min jooksul ei olnud ka produkti tekkimist näha (Lisa 12), kuid 24 h jooksul oli siiski mingil määral produkti, Fmoc-Ala-asaVala-Phe-NH₂ (Skeem 15), tekkinud (Lisa 13). Kineetilisi parameetreid ei saanud antud tulemuste põhjal määrata, sest Fmoc-iga ja Fmoc-ita ühendite neelduvused on väga erinevad. AsaVal on külgehela tõttu steriilselt takistatud ning see võib selgitada, miks Fmoc-kaitserühma ei õnnestunud asaVal külge siduda. Varasemalt on seda meetodit kasutatud väiksema steriilsuse mahukusega asa-aminohapete korral, seega järeldati, et Fmoc-kaitserühma tagasi sidumise meetodika vajab edasi uurimist ja arendamist steriilselt takistatud külgehelaga asa-aminohapete jaoks. Kuna 30 min jooksul ei olnud produkti tekkinud, otsustati jätkata mudelpeptiidis asa-peptiidsideme moodustumise testimist Ghosez reagentiga, sest meie teadusgrupis varasemalt tehtud eelkatsed näitasid selle aktivaatoriga paremaid tulemusi (72%) pärast 24 h reaktsiooni.



Skeem 15. Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH₂ struktuur

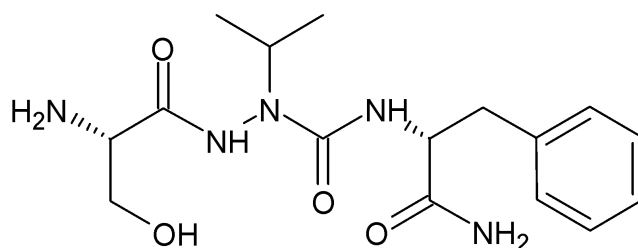
4.4 H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ süntees Ghosez reagentiga

Et võrrelda aktivaatori efektiivsust meie teadusgrupi varasemate tulemustega [4], testiti kõigepealt asa-peptiidsideme moodustumist Ghosez reagentiga Ala ja asaVal vahel 25°C juures asa-peptiidi mudelühendis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ (vt. 3.2.6). 24 h jooksul võeti tsentrifuugituubis asuvast reaktsioonisegust proove ning neile tehti HPLC-MS analüüs (Lisad 14-16). Seekord jäeti Fmoc-kaitserühm lähteainele sidumata, sest katsed aktivaatoriga TCFH näitasid, et meetodika vajab veel optimeerimist. HPLC analüüsi tulemuste põhjal koostati kineetiline kõver (Joonis 1) ning sellelt on võimalik näha, et reaktsioon on praktiliselt

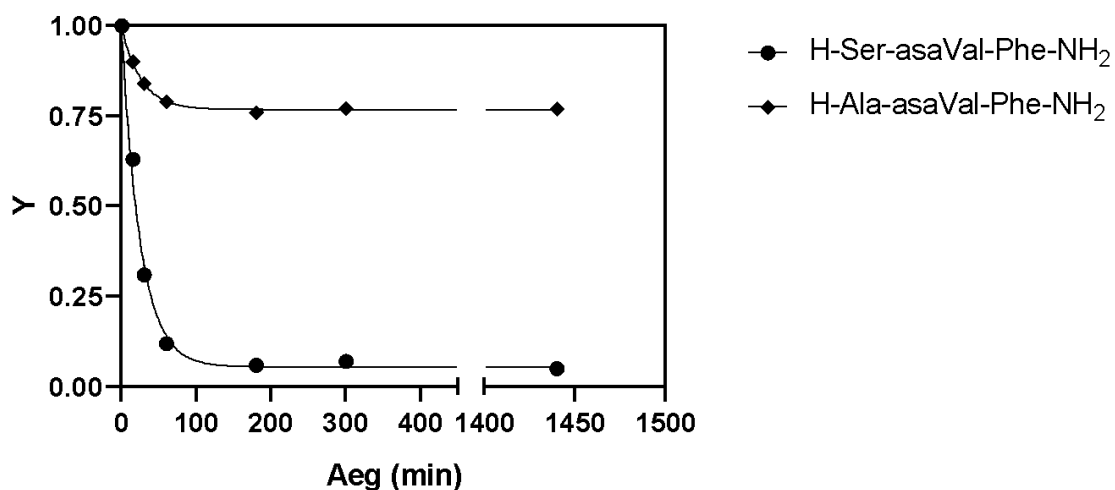
lõppenud 1 h-ga ning reaktsiooni saagiseks on 23%. Varasemalt meie uurimisgrupis tehtud eelkatsetega (72%) võrreldes on need oluliselt kehvemad ning seetõttu tehti samade reagentide kogustega korduskatse, kus analüüsiti 24 h jooksul moodustunud reaktsioonisaadust HPLC-MS meetodil (Lisa 17). Korduskatsega sooviti tuvastada, kas saagiste vähenemine võiks olla seotud ka aktivaatori enda lagunemisega ajas. HPLC-MS tulemused näitasid nüüd veel vähenenud reaktsiooni saagist pärast 24 h reaktsiooni, milleks oli 14%.

4.5 H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ süntees Ghosez reagentiga

Töö viimases osas sünteesiti PKA (proteiinkinaas A) miinimumsubstraat RRASasaVA, kus asa-peptiidside on asaVal ja Ser vahel. Ghosez reagenti efektiivsuse testimiseks Ser lisamisel asaVal-ile viidi asa-peptiidisideme moodustumise reaktsioon läbi esmalt mudelpeptiidis H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ (Skeem 16) varem välja töötatud meetodi kohaselt (vt 3.2.6). Reaktsiooni jaoks kasutati aktivaatorina värskelt avatud Ghosez reagenti, sest katsed mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ viitasid aktivaatori lagunemisele. Reaktsioon viidi läbi filtriga varustatud süstlas ja loksuti peal, sest alusena kasutatav tahke NaHCO₃ vajus tsentrifuugituubis põhja, reaktsioonisegu segamine ei olnud ühtlane ning ka proovide võtmine oli keeruline. Reaktsioonil lasti toimuda toatemperatuuril $22,5 \pm 0,2$ °C juures. Reaktsioonisegust võetud proovid analüüsiti HPLC-MS meetodil, mille tulemuste põhjal koostati kineetiline kõver (Joonis 1) ja arvutati moodustunud tripeptiidi reaktsionisaagis ($1-Y_{\infty}$) ning reaktsiooni pseudo-esimest järku kiiruskonstant $k_{\text{obs}} = 0,0401 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$ (vt 3.2.7). Jooniselt 1 on näha, et asa-peptiidisideme moodustumise reaktsioon on praktiliselt lõppenud 1 h pärast ning reaktsionisaagis seejuures on 95% (Lisa 18). Tegemist on meie uurimisgrupi seni parima tulemusega, mis puudutab asaVal-le järgmise aminohappe sidumist.



Skeem 16. H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ struktuur



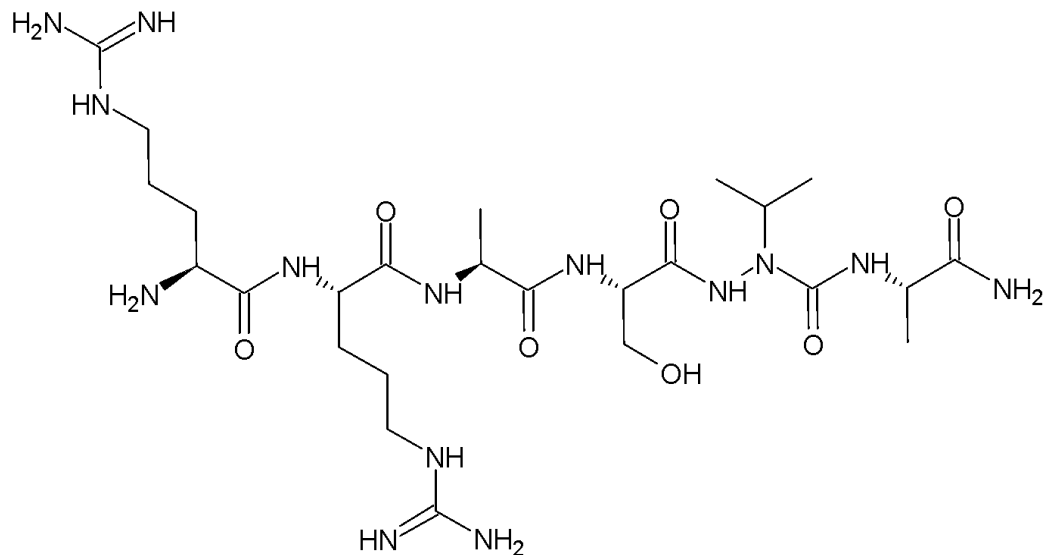
Joonis 1. Ghosez reagentiga aktiveeritud Fmoc-L-Ala-OH või Fmoc-L-Ser-OH ja H-asaVal-Phe-NH-vaik vahelise reaktsiooni kineetiline kõver.

4.6 Proteiinkinaas A miinimumsubstraat RRASasaVA süntees

Sünteesi alustati vaigule Ala kinnitamisest punktis 3.2.1 kirjeldatud eeskirja järgi aktiveerides lisatavat aminohapet HBTU ja HOBt-ga ja sidumisetapi edukust kontrolliti Kaiseri testiga. Järgmisena seoti tahkele kandjale asaVal prekursor 3.2.2 eeskirja järgi, kus prekursorit aktiveeriti BTC-ga ning sünteesi edukust kontrolliti HPLC-MS analüüsiga (Lisa 6). Reageerimata jäänud lähteaine tuvastamiseks kromatogrammil seoti sellele 3.2.3 eeskirja järgi tagasi Fmoc-kaitserühm ning tulemustest selgus, et Fmoc-asaVal-Ala-NH-vaiku oli tekkinud 91%. Järgmiseks etapiks oli asaVal-le Ser sidumine ja katsed mudelpeptiidides näitasid, et Ghosez reagent on hetkel teadaolevatest aktivaatoritest kõige efektiivsem asa-peptiidside moodustamiseks. Ser aktiveeriti Ghosez reagentiga punkti 3.2.6 eeskirja järgi ning kõrgema saagise saamiseks korrati seda etappi lisades reagentide juurde. Reaktsiooni edukust kontrolliti HPLC-MS analüüsiga (Lisad 7-8). Reagentide juurde

lisamisega produkti juurde küll ei tekkinud, kuid selle etapi reaktsioonisaagis oli üllatavalt kõrge, 94%. Seega jätkati aminohapete peptiidijärjestusse lisamisega. Ala aktiveeriti HBTU ja HOBt-ga punktis 3.2.1 eeskirja järgi ning seoti Ser külge, millelt oli eelnevalt eemaldatud Fmoc-kaitserühm. Reaktsiooni toimumist kontrolliti Kaiseri testiga. Järgnevalt pandi sama eeskirja järgi külge Arg ning sellele etapi edukuse hindamiseks tehti samuti Kaiseri test. Viimase Arg külge panemist tehti kaks korda, kuna Kaiseri test näitas esimesel korral

reageerimata jäänud aminorühmi. Lõpliku peptiidijärjestuse määramiseks tehti sellele HPLC-MS analüüs (Lisa 9). Edasi eemaldati Fmoc-RRASasaVA-NH-vaigult Fmoc-kaitserühm ning sünteesitud peptiid eemaldati tahkelt kandjalt tugevalt happelise lahusega (vt. 3.2.4). Enne toorpeptiidi HPLC analüüsi (Lisa 10) ja preparatiivset puhastamist vedelik-kromatograafilisel meetodil, lahustati see Milli-Q vees, külmutati ja lüofiliseeriti täielikuks kuivatamiseks. HPLC analüüsil (Lisa 11) määrati toorpeptiidi puhtus, milleks oli 73%. Preparatiivse HPLC meetodiga PKA miinimumsubstraadi RRASasaVA (Skeem 17) puhtust kontrolliti HPLC analüüsiga ning selle puhtuseks saadi 93%. Puhastatud peptiid kaaluti ning reaktsioonisaagiseks arvatati 20%. Tegemist on väga hea saagisega kui arvestada, et meie uurimisgrupis varasemalt sünteesitud asa-peptiidide H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂ sünteesisaagisteks saadi <2%, kus asa-peptiidsideme moodustamiseks kasutati aktivaatorit COMU.



Skeem 17. Proteiinkinaas A miinimumsubstraat RRASasaVA

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli sünteesida PKA miinimumsubstraadi RRASVA asa-analoog RRASasaVA ning selle tegemiseks oli vaja leida asa-peptiidsideme moodustamiseks sobiv aminohappe aktivaator ning reaktsioonitingimused. Etapi keerukus seisneb aminohappe sidumisel asaVal-i *N*-terminaalile, kuna asaVal omab steeriliselt takistatud külgrühma ning sellisel juhul ei toimi traditsioonilises tahkefaasi peptiidsünteesis kasutatavad aktivaatorid. Aktivaatori sobivust testiti mudelpeptiidides H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ ja H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ viies läbi kineetilisi mõõtmisi asa-peptiidsideme moodustumise etapis. Antud töös katsetati asa-peptiidsideme moodustamiseks aktivaatoreid TCFH ja Ghosez reagent. Lisaks tuli sünteesida mudelpeptiidides ja RASasaVA sünteesis vajaminev asaVal prekursor, mis ei ole kommertsiaalselt kättesaadav.

Prekursori süntees oli edukas ning seda kasutati mudelpeptiidide ja RRASasaVA sünteesimiseks. Aminohapete sidumiseks peptiidiahelasse kasutati käesolevas töös SPPS meetodit. Kineetilised mõõtmised aktivaatoriga TCFH asa-peptiidsideme moodustamiseks mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ näitasid, et 24 h jooksul tekib vähesel määral produkti (kineetilisi parameetreid ei õnnestunud määrata), kuid meetodika vajab edasiarendamist, sest praegu ei ole see rahuldavate saagistega. Ghosez reagenti efektiivsust asa-peptiidsideme moodustamisel uuriti kahes mudelpeptiidis ning kõige kõrgem reaktsionisaagis (95%) saadi asa-peptiidi mudelühendi H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ sünteesimisel värskest avatud reagentiga. Sama aktivaatorit kasutati edukalt ka Ser ja asaVal vahelise reaktsiooni läbiviimiseks RRASasaVA sünteesimisel. PKA miinimumsubstraat RRASVA asa-analoog RRASasaVA süntees ning puhastamine oli edukas, kuna puhta peptiidi sünteesisaagiseks saadi 20% ja meie uurimisgrupi varasemate asa-peptiidide H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂ saagised olid < 2%.

Töö edasiarendamiseks tasub uurida Ghosez reagenti efektiivsust, varieerides asaVal-i *N*-terminaalile seotavaid aminohappeid ning nende külgrühma mahukuse mõju asa-peptiidsideme moodustumise kiirusele ja sünteesisaagistele. Samuti võib varieerida asa-aminohappe enda struktuuri ja testida Ghosez reagenti sobivust erineva järjestusega asa-peptiidide sünteesimiseks. Aktivaatorit TCFH võib veel testida asa-peptiidsideme moodustamiseks, varieerides aluseid ja reaktsioonitingimusi.

SUMMARY

The aim of this research was to synthesize PKA minimum substrate RRASVA aza-analogue RRASazVA. In order to achieve this, it was necessary to find a suitable amino acid activator and optimal reaction conditions for the formation of aza-peptide bond. That step is complicated due to the steric bulkiness of azVal side group. In this case traditional SPPS activators have proved to be ineffective. The kinetics of aza-peptide bond formation was investigated in the model peptides H-Ala-azVal-Phe-NH₂ and H-Ser-azVal-Phe-NH₂ comparing two activators: TCFH and Ghosez reagent. In addition, the azVal precursor needed in the model peptides and RRASazVA synthesis, which is not commercially available, had to be synthesized.

The synthesis of the precursor was successful, and it was used in experiments with model peptides as well as in the synthesis of RRASazVA. The traditional SPPS method was used in this work to couple amino acids into the peptide chain. Kinetic measurements for aza-peptide bond formation with the activator TCFH in the peptide H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ showed that a small amount of product is formed within 24 h (kinetic parameters could not be determined). However, the method needs further development, as the current yield is not satisfactory. The efficiency of the Ghosez reagent in the formation of an aza-peptide bond was investigated in two model peptides, and the highest reaction yield (95%) was obtained when synthesizing the aza-peptide model compound H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ with a freshly opened reagent. The same activator was also successfully used to carry out the reaction between Ser and asaVal in the synthesis of RRASazVA. The synthesis and purification of the aza-analogue RRASazVA, the minimal substrate of PKA, was successful since the yield of purified aza-peptide was 20%. This can be considered as an excellent result because the yields of previously synthesized aza-peptides H-RRazASVA-NH₂ and H-RRASVazA-NH₂ in our research group were <2%.

In order to further develop this research, it is worth investigating the effectiveness of the Ghosez reagent by varying the amino acids attached to the *N*-terminus of asaVal and the effect of the steric bulkiness of their side group on the synthesis rate and yields. Also, the structure of the aza-amino acid itself should be varied and the Ghosez reagent should be tested to synthesize aza-peptides with different sequences. The activator TCFH can be further tested for aza-peptide bond formation using different bases and reaction conditions.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Avan, I.; Hall, C.D.; Katritzky, A.R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 3575–3594.
- [2] von Hentig, N. Atazanavir/Ritonavir: A Review of Its Use in HIV Therapy. *Drugs Today (Barc)*, **2008**, *44*, 103–132.
- [3] Ploom, A.; Mastitski, A.; Arujõe, M.; Troska, A.; Järv, J. Aza-Peptides: Expectations and Reality. *PEAS*, **2022**, *71*, 241.
- [4] Troska, A.; Arujoe, M.; Mastitski, A.; Jarv, J.; Ploom, A. Steric Impact of Aza-Amino Acid on Solid-Phase Aza-Peptide Bond Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **2021**, *69*, 152973.
- [5] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **2017**, *58*, 3421–3425.
- [6] McMechen, M.A.; Willis, E.L.; Gourville, P.C.; Proulx, C. Aza-Amino Acids Disrupt β -Sheet Secondary Structures. *Molecules*, **2019**, *24*, 1919.
- [7] α -Chloro Enamines, Reactive Intermediates for Synthesis: 1-Chloro- N,N ,2-Trimethylpropenylamine. *Org. Synth.*, **1979**, *59*, 26.
- [8] Al Musaimi, O.; Al Shaer, D.; Albericio, F.; de la Torre, B.G. 2022 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2023**, *16*, 336.
- [9] Al Shaer, D.; Al Musaimi, O.; Albericio, F.; de la Torre, B.G. 2023 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*, 243.
- [10] de la Torre, B.G.; Albericio, F. Peptide Therapeutics 2.0. *Molecules*, **2020**, *25*, 2293.
- [11] Furukawa, N.; Popel, A.S. Peptides That Immunoactivate the Tumor Microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **2021**, *1875*, 188486.
- [12] Zega, A. Azapeptides as Pharmacological Agents. *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, *12*, 589–597.
- [13] Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V.J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Curr Opin Chem Biol*, **2008**, *12*, 292–296.
- [14] Dutta, A.S.; Morley, J.S.; Park, A. Polypeptides. Part XII.I.1 Preparation of α -Aza-Amino-Acid (Carbamic Acid) Derivatives and Intermediates for the Preparation of α -Aza-Peptides. **1975**.
- [15] André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. Aza-Peptides. III. Experimental Structural Analysis of Aza-Alanine and Aza-Asparagine-Containing Peptides. *The Journal of Peptide Research*, **1997**, *50*, 372–381.
- [16] Thormann, M.; Hofmann, H.-J. Conformational Properties of Azapeptides. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **1999**, *469*, 63–76.
- [17] Begum, A.; Dodoala, S.; Prasad, K.; Koganti, B. A Review on Azapeptides: The Promising Peptidomimetics. *Asian Journal of Chemistry*, **2017**, *29*, 1879–1887.
- [18] Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W.D. Azapeptides and Their Therapeutic Potential. *Future Medicinal Chemistry*, **2011**, *3*, 1139–1164.
- [19] Fan Cheng, K.; VanPatten, S.; He, M.; Al-Abed, Y. Azapeptides -A History of Synthetic Milestones and Key Examples. *Curr Med Chem*, **2022**, *29*, 6336–6358.

- [20] Huang, Y.; Malcolm, B.A.; Vederas, J.C. Synthesis and Testing of Azaglutamine Derivatives as Inhibitors of Hepatitis A Virus (HAV) 3C Proteinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1999**, *7*, 607–619.
- [21] Fässler, A.; Bold, G.; Capraro, H.-G.; Cozens, R.; Mestan, J.; Poncioni, B.; Rösel, J.; Tintelnot-Blomley, M.; Lang, M. Aza-Peptide Analogs as Potent Human Immunodeficiency Virus Type-1 Protease Inhibitors with Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3203–3216.
- [22] Melendez, R.E.; Lubell, W.D. Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of N-Boc-Aza1-Dipeptides in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6759–6764.
- [23] Habashi, M.; Vutla, S.; Tripathi, K.; Senapati, S.; Chauhan, P.S.; Haviv-Chesner, A.; Richman, M.; Mohand, S.-A.; Dumulon-Perreault, V.; Mulamreddy, R.; Okun, E.; Chill, J.H.; Guérin, B.; Lubell, W.D.; Rahimipour, S. Early Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease by Targeting Toxic Soluble A β Oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2022**, *119*, e2210766119.
- [24] Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149–2154.
- [25] Musaimi, O.A.; Torre, B.G. de la; Albericio, F. Greening Fmoc/tBu Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chem.*, **2020**, *22*, 996–1018.
- [26] Bayer, E.; Mutter, M.; Uhmann, R.; Polster, J.; Mauser, H. Kinetic Studies of the Liquid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 7333–7336.
- [27] Sharma, A.; Kumar, A.; de la Torre, B.G.; Albericio, F. Liquid-Phase Peptide Synthesis (LPPS): A Third Wave for the Preparation of Peptides. *Chem. Rev.*, **2022**, *122*, 13516–13546.
- [28] Quibell, M.; Turnell, W.G.; Johnson, T. Synthesis of Azapeptides by the Fmoc/tBu-Polyamide Technique.
- [29] Freeman, N.S.; Tal-Gan, Y.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis: Aza Scan of a PKB/Akt Inhibitor Using Aza-Arginine and Aza-Proline Precursors. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 3078–3085.
- [30] 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*, 864–878.
- [31] 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). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, *13*, 4408–4424.
- [32] Sokolova, T.A.; Zapevalova, N.P. Acylation of Hydrazine and Its Substituted Derivatives with Derivatives of A β -u Hsaturated Monobasic Acids. *Russian Chemical Reviews*, **1969**.
- [33] Borch, R.F.; Bernstein, M.D.; Durst, H.D. Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2897–2904.
- [34] Stawikowski, M.; Fields, G.B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci*, **2002**, *Chapter*, 18.1.

- [35] Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol Biotechnol*, **2006**, *33*, 239–254.
- [36] Jaradat, D.M.M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids*, **2018**, *50*, 39–68.
- [37] 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. *Analytical Biochemistry*, **1970**, *34*, 595–598.
- [38] Nigst, T.A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 8142–8155.
- [39] 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. *Journal of Peptide Science*, **1997**, *3*, 429–441.
- [40] Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C. In Situ Generation of Fmoc-Amino Acid Chlorides Using Bis-(Trichloromethyl)Carbonate and Its Utilization for Difficult Couplings in Solid-Phase Peptide Synthesis. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, **1999**, *53*, 507–517.
- [41] 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.
- [42] Cotarca, L.; Geller, T.; Répási, J. Bis(Trichloromethyl)Carbonate (BTC, Triphosgene): A Safer Alternative to Phosgene? *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, *21*, 1439–1446.
- [43] Tarchoun, K.; Yousef, M.; Bánóczy, Z. Azapeptides as an Efficient Tool to Improve the Activity of Biologically Effective Peptides. *Future Pharmacology*, **2022**, *2*, 293–305.
- [44] Fauchère, J.-L.; Charton, M.; Kier, L.B.; Verloop, A.; Pliska, V. Amino Acid Side Chain Parameters for Correlation Studies in Biology and Pharmacology. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **1988**, *32*, 269–278.
- [45] Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **2018**, *59*, 2010–2013.
- [46] 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*, 4218–4222.

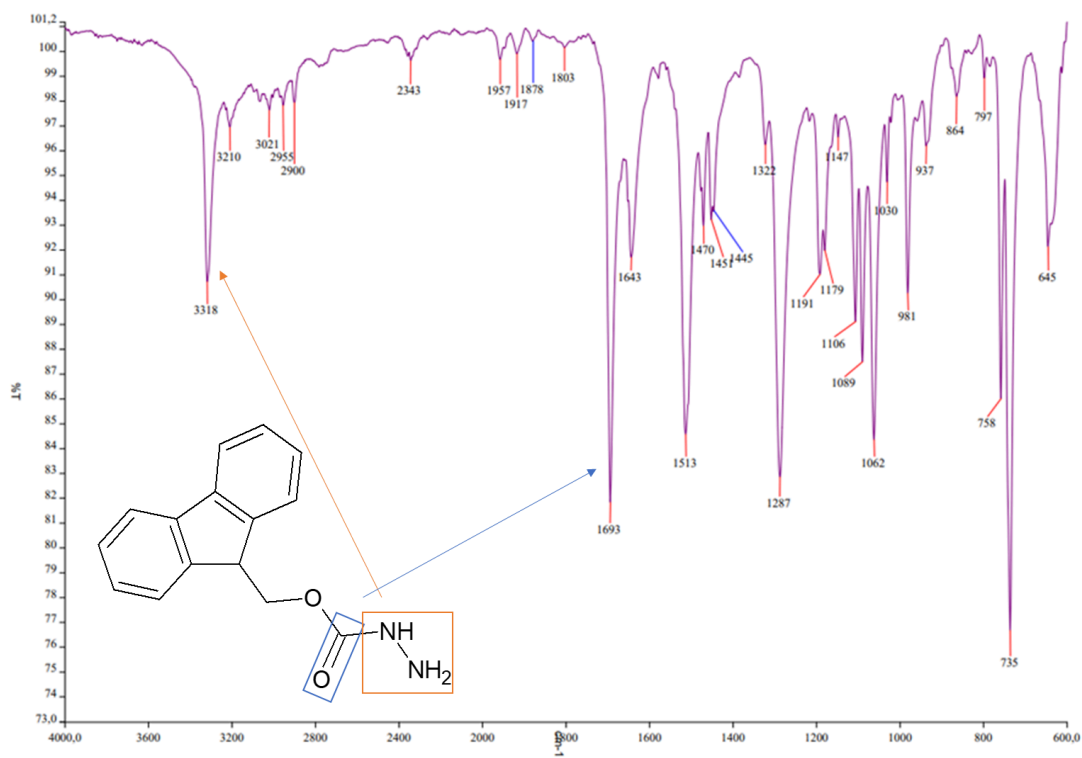
TÄNUAVALDUS

Töö autor soovib tänada oma juhendajaid dr Anu Ploomi ja Alla Troska-Pallat (MSc), kes olid suureks abiks käesoleva bakalaureusetöö valmimisel. Autor tänab juhendaid nende väärtusliku aja ja hindamatu panuse eest.

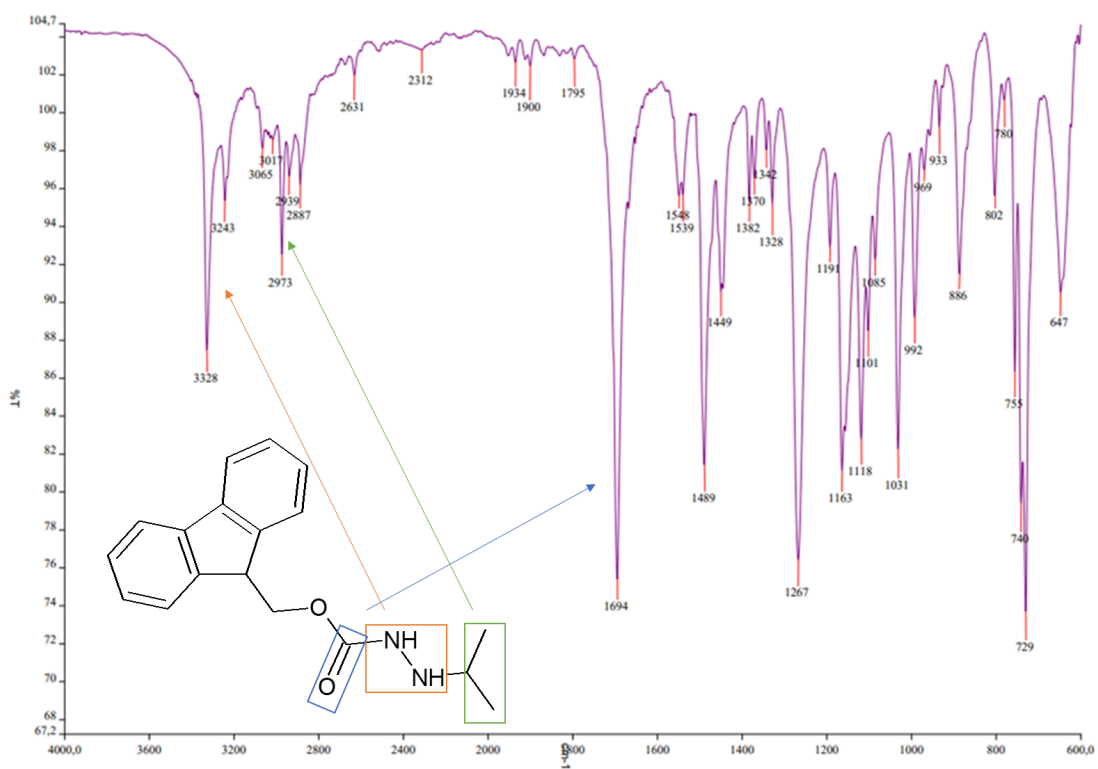
Autor tänab ka dr Anton Mastitskit abi eest asVal prekursori sünteesil.

LISAD

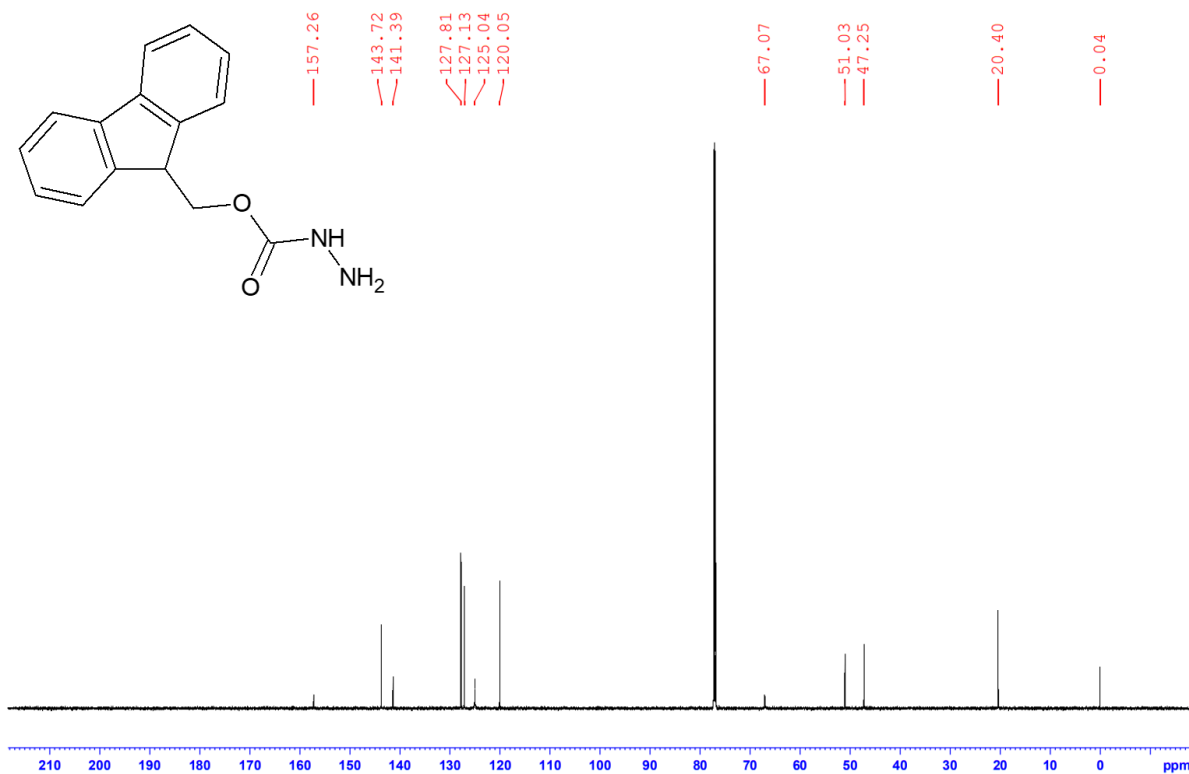
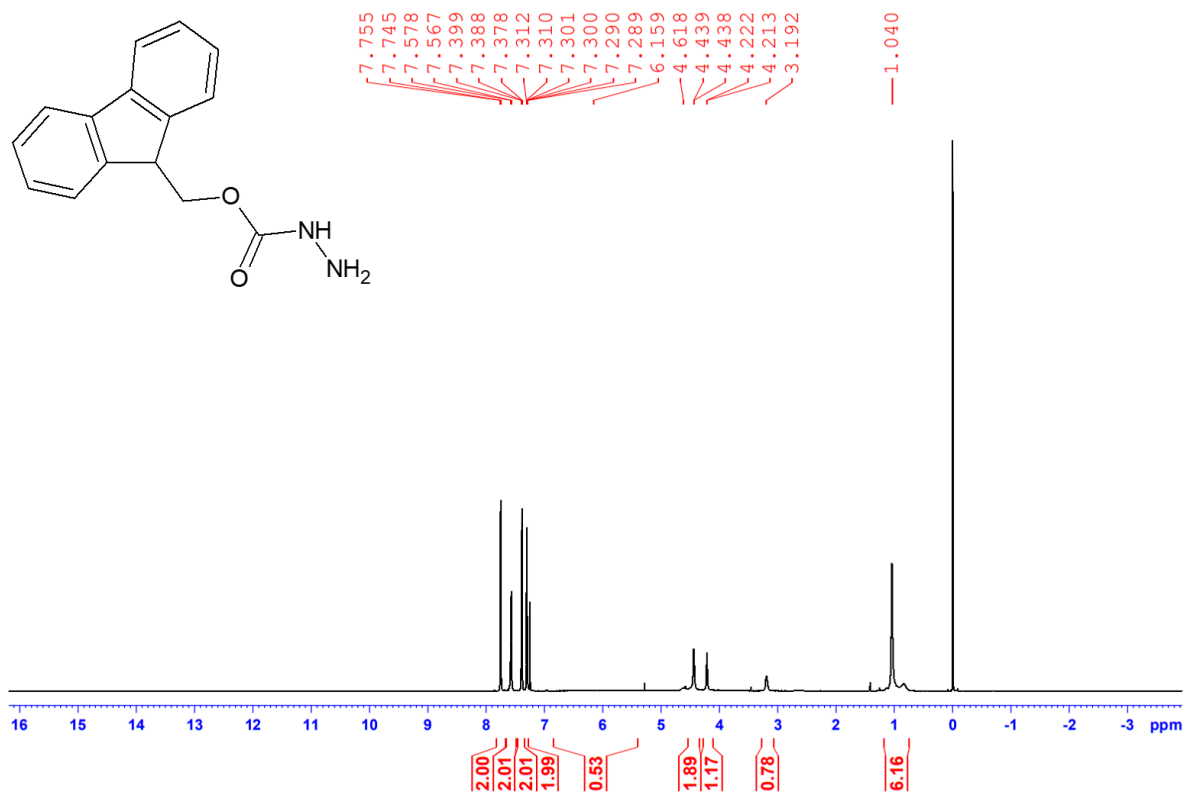
Lisa 1. Fmoc-hüdrasiini IP analüüs



Lisa 2. AsaVal prekursori IP analüüs

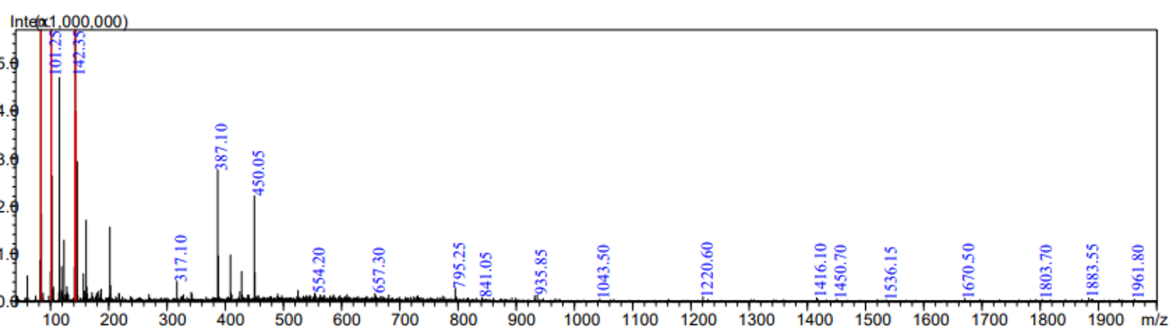
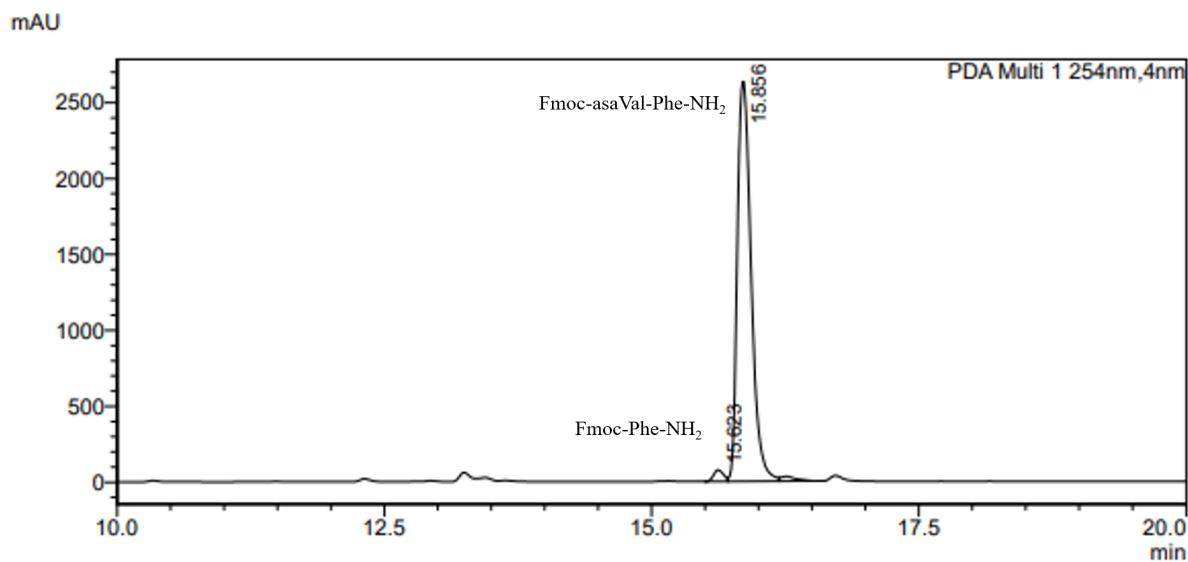


Lisa 3. AsaVal prekursori TMR analüüs

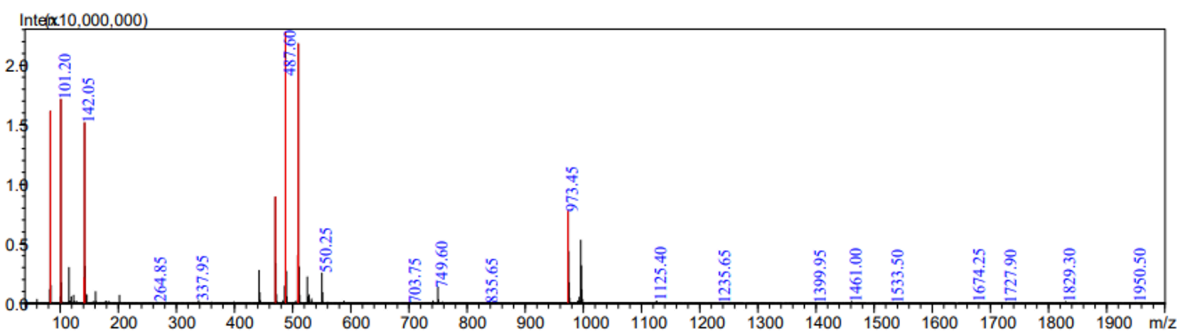


Lisa 4. AsaVal sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂.

Proov lahustati 20% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 20 – 70%.



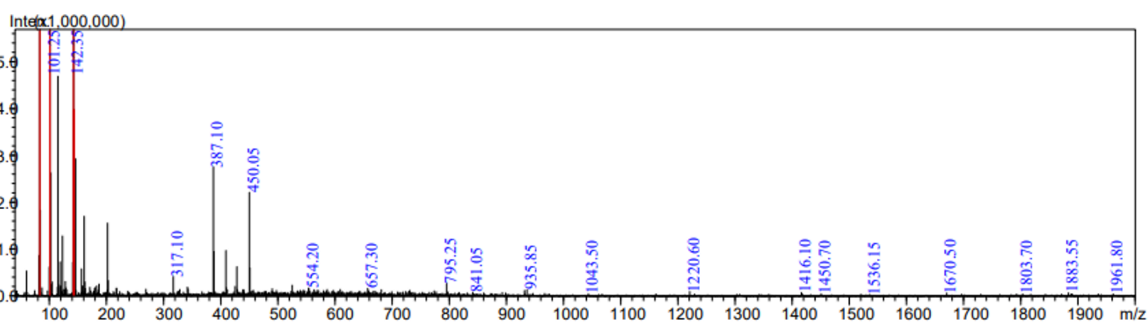
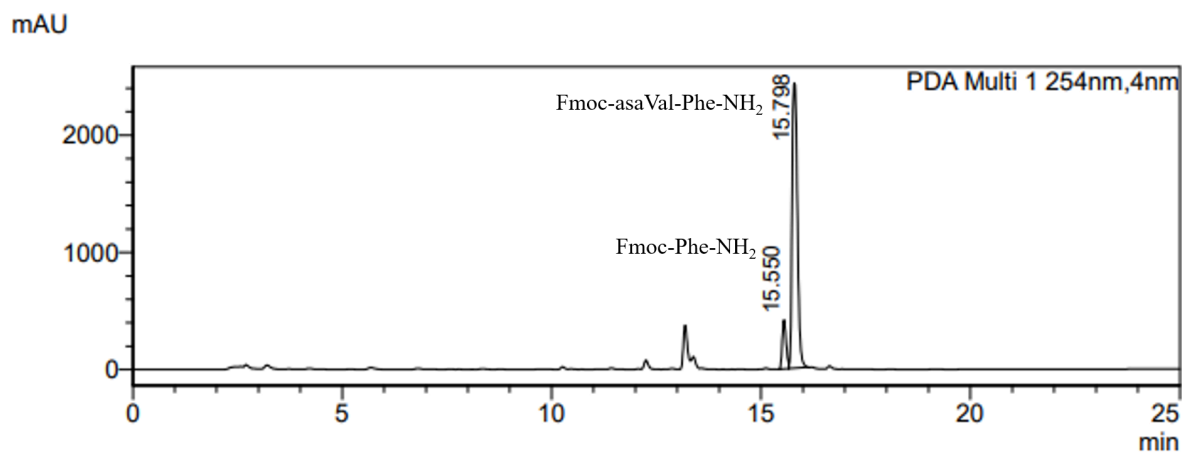
Fmoc-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 387 m/z; [M+ACN+Na] = 450 m/z



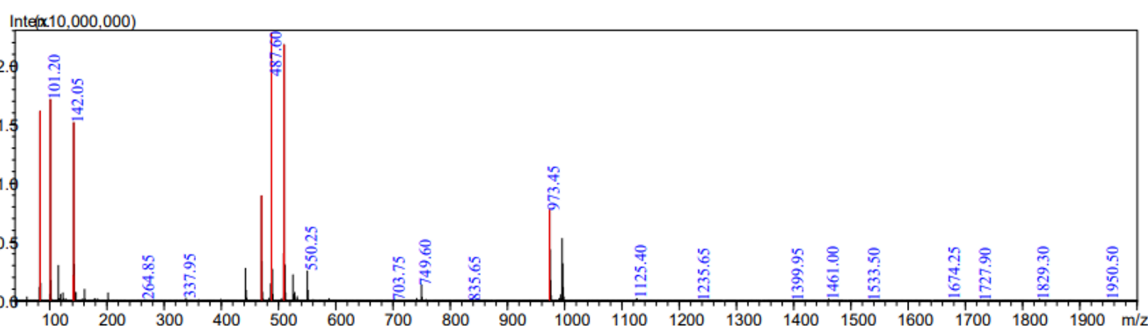
Fmoc-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 487 m/z; [2M+H] = 973 m/z

Lisa 5. AsaVal sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ser-asaVal-Phe-NH₂.

Proov lahustati 20% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 20 – 70%.



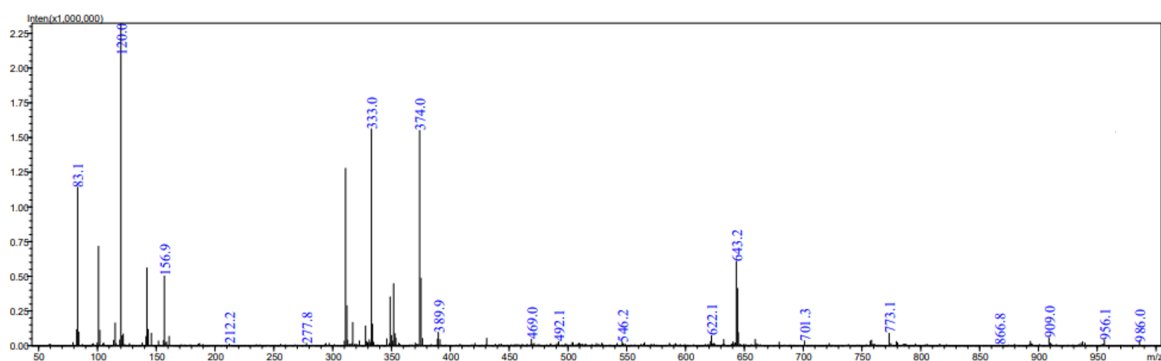
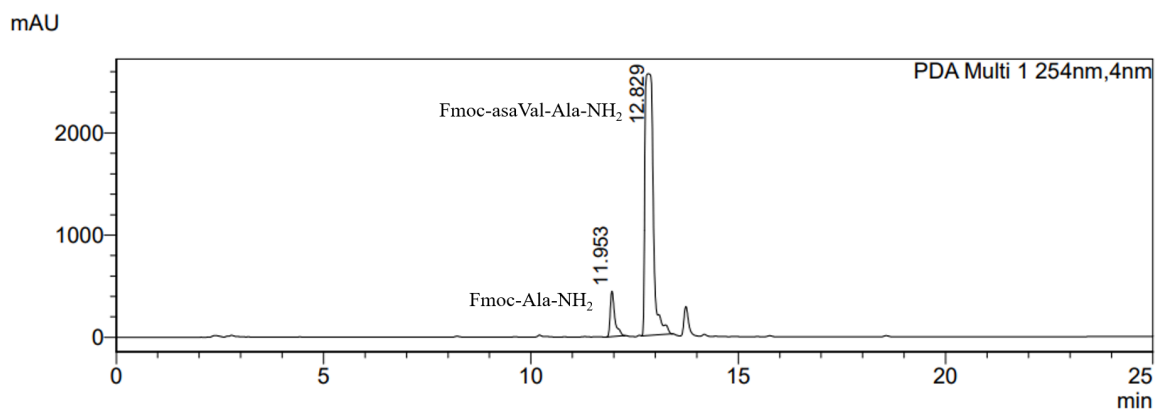
Fmoc-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 387 m/z; [M+ACN+Na] = 450 m/z



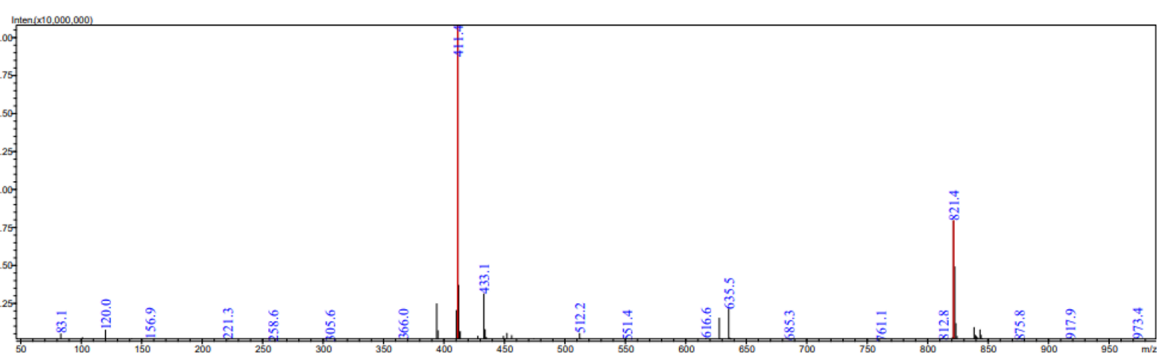
Fmoc-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 487 m/z; [2M+H] = 973 m/z

Lisa 6. AsaVal sidumise etapi kromatogramm ja massispekter peptiidis RRASasaVA.

Proov lahustati 20% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 20 – 70%.



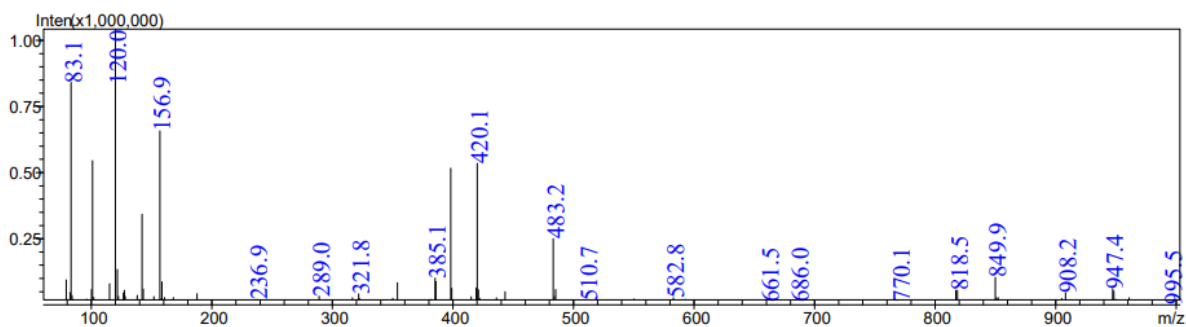
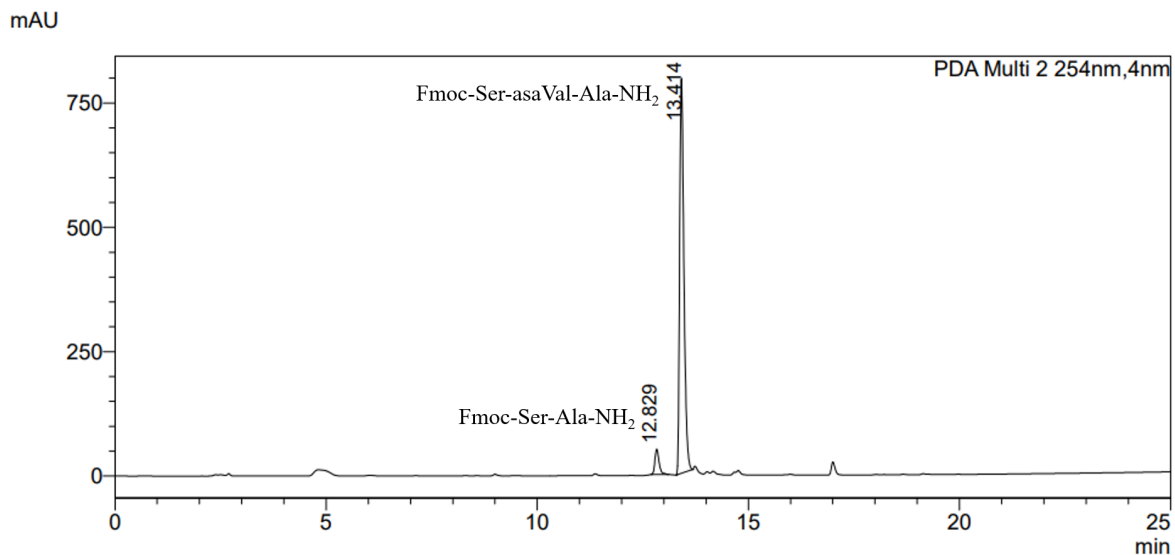
Fmoc-Ala-NH₂ massispekter. $[M+H] = 311$ m/z; $[M+Na] = 332$ m/z; $[M+ACN+H] = 374$ m/z; $[2M+Na] = 643$ m/z



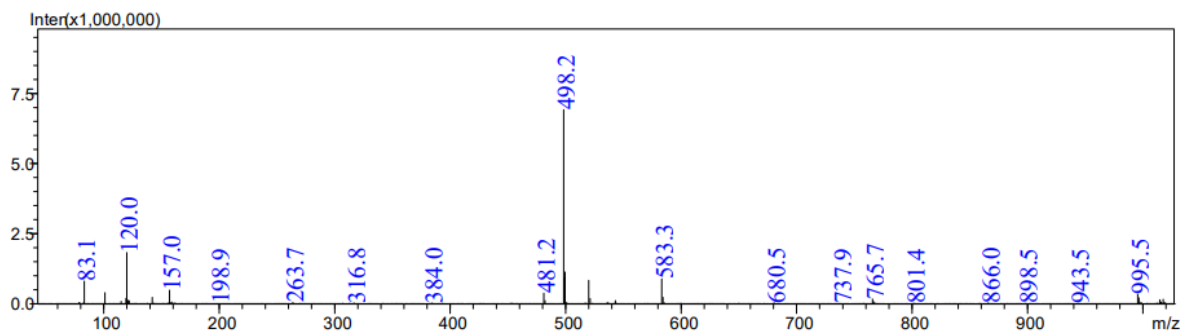
Fmoc-asaVal-Ala-NH₂ massispekter. $[M+H] = 411$ m/z; $[M+Na] = 432$ m/z; $[2M+Na] = 821$ m/z

Lisa 7. Ser sidumise etapi kromatogramm ja massispekter pärast reagentide esmakordset lisamist peptiidis RRASasaVA, aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



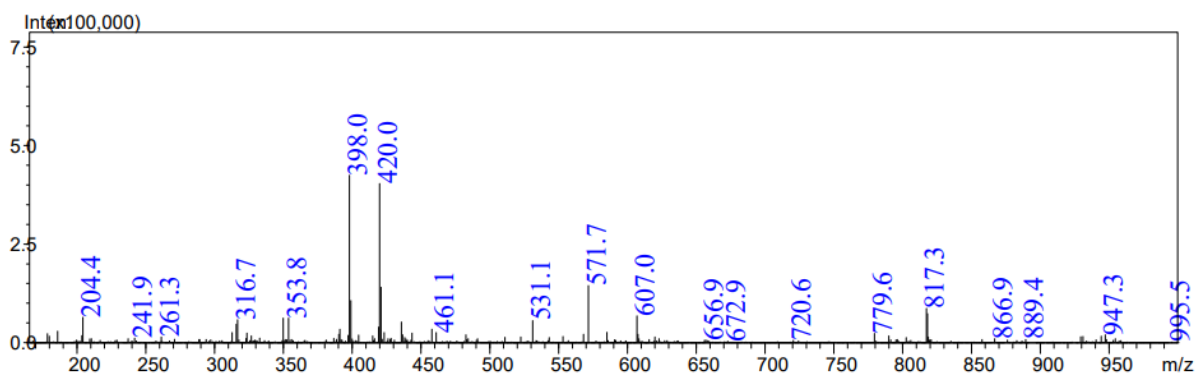
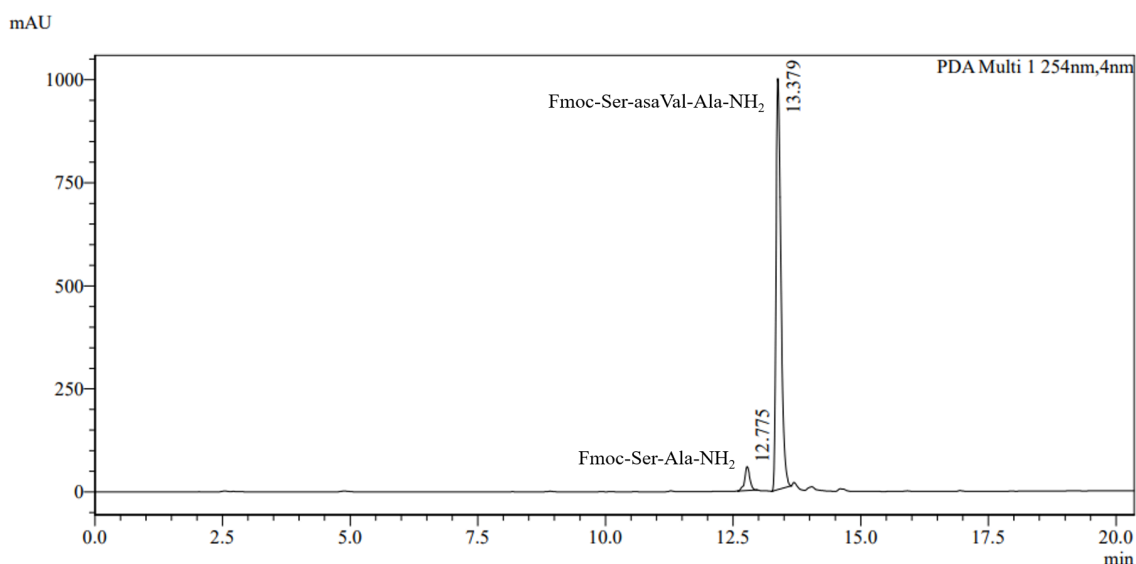
Fmoc-Ser-asaVal-Ala-NH₂ massispekter. [M+H] = 398 m/z; [M+Na] = 420 m/z



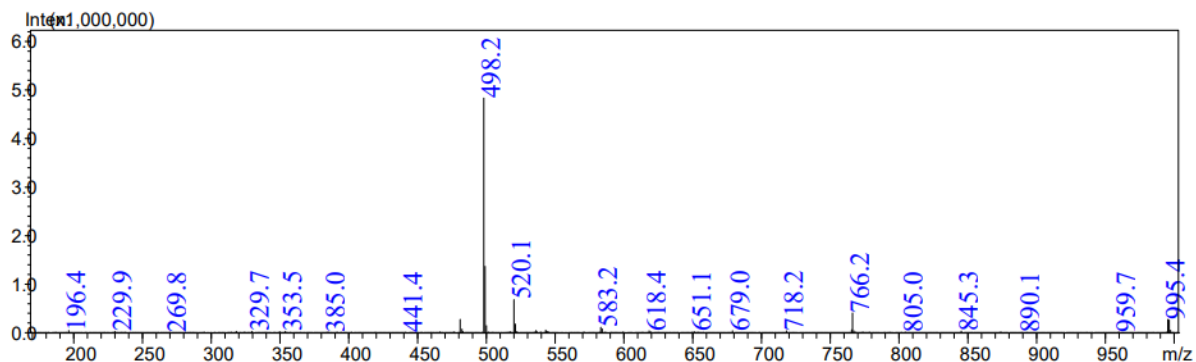
Fmoc-Ser-Ala-NH₂ massispekter. [M+H] = 498 m/z

Lisa 8. Ser sidumise etapi kromatogramm ja massispekter pärast reagentide teistkordset lisamist peptiidis RRASasaVA, aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



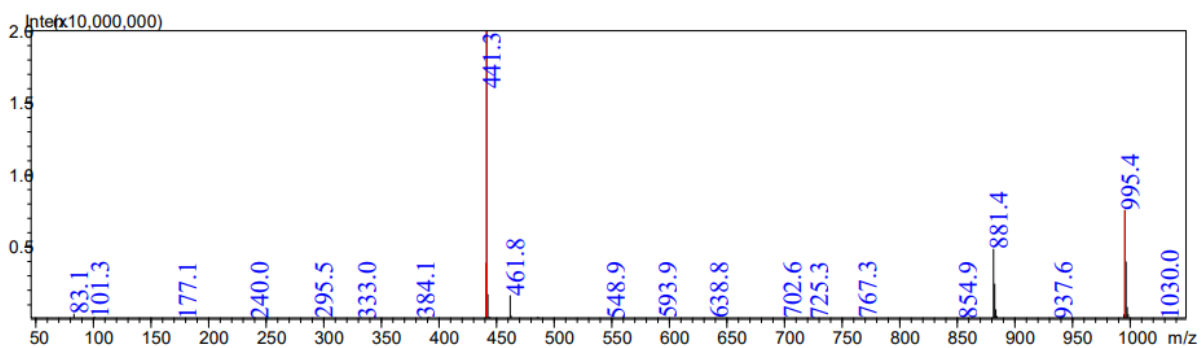
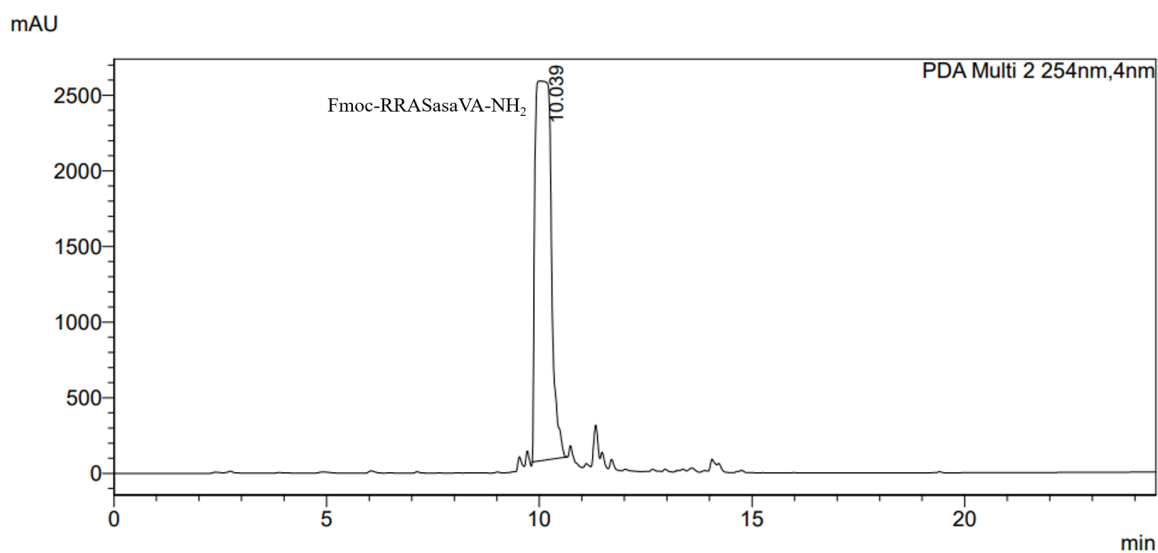
Fmoc-asaVal-Ala-NH₂ massispekter. [M+H] = 398 m/z; [M+Na] = 420 m/z



Fmoc-Ser-Ala-NH₂ massispekter. [M+H] = 498 m/z; [M+Na] = 520 m/z

Lisa 9. Arg sidumise etapi kromatogramm ja massispekter pärast reagentide teistkordset lisamist peptiidis RRASasaVA.

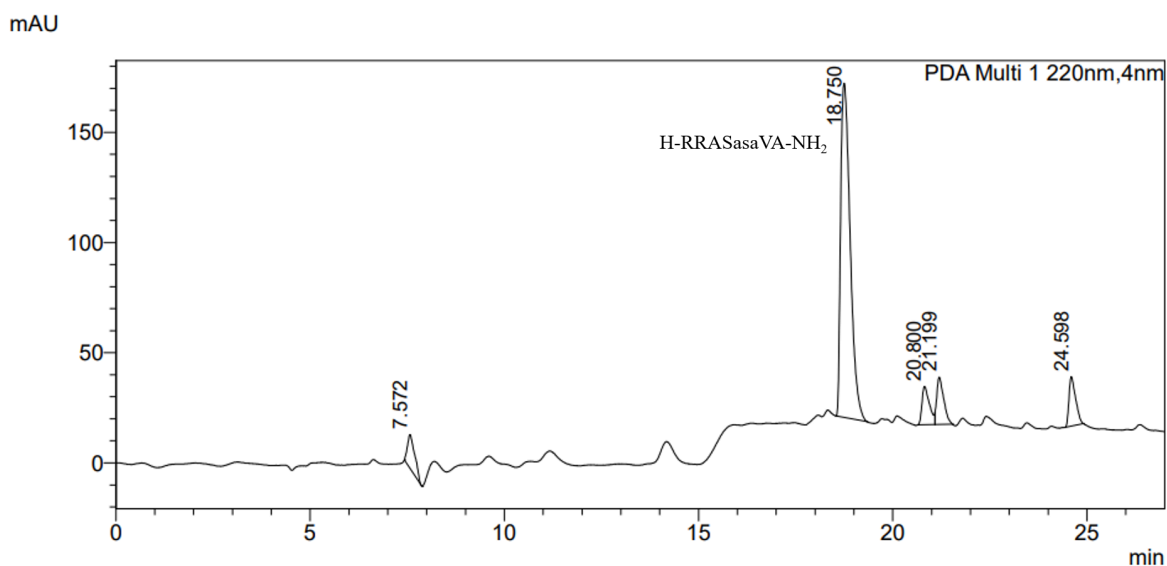
Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



Fmoc-RRASasaVA-NH₂ massispekter. [M+H] = 881 m/z; [2M+H] = 441 m/z; [M+TFA+H] = 995 m/z

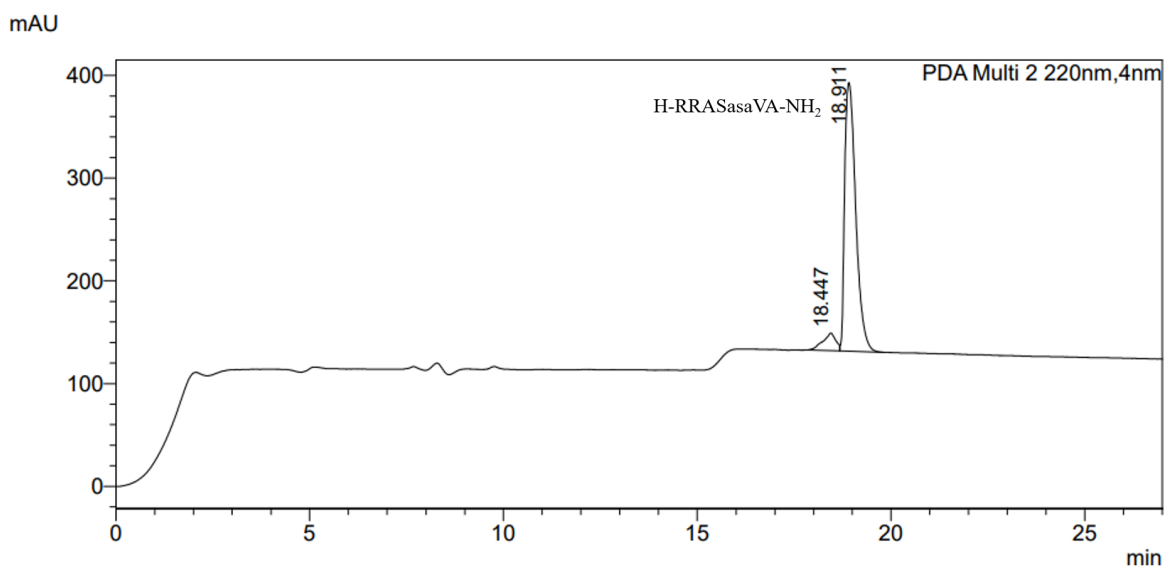
Lisa 10. Puhastamata toorpeptiid H-RRASasaVA-NH₂ kromatogramm.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 25 min voolukiirusel 5 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 25%.



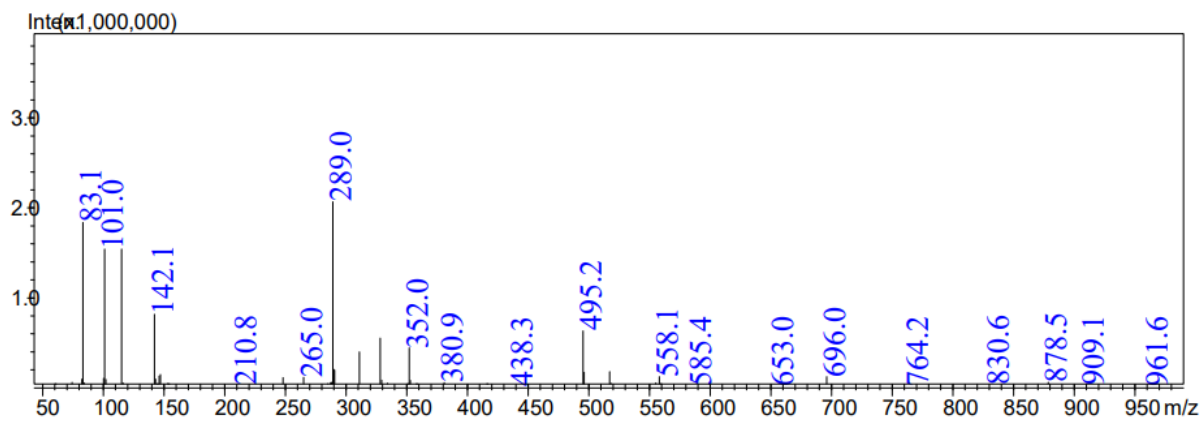
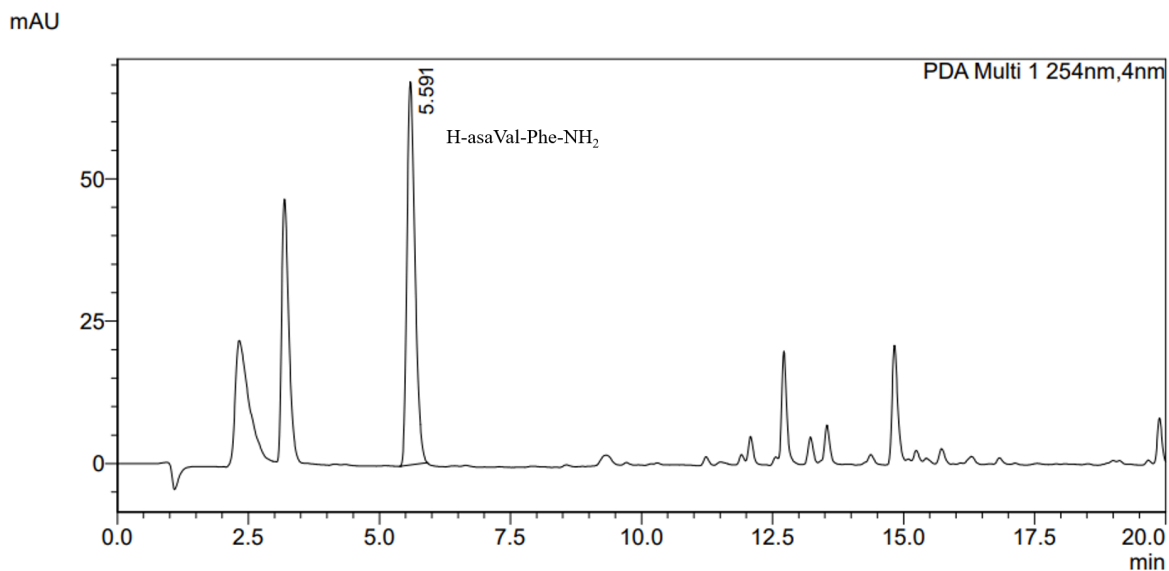
Lisa 11. Puhastatud peptiid H-RRASasaVA-NH₂ kromatogramm.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 25 min voolukiirusel 5 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 25%.



Lisa 12. Ala sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 30 min; aktivaatoriks TCFH.

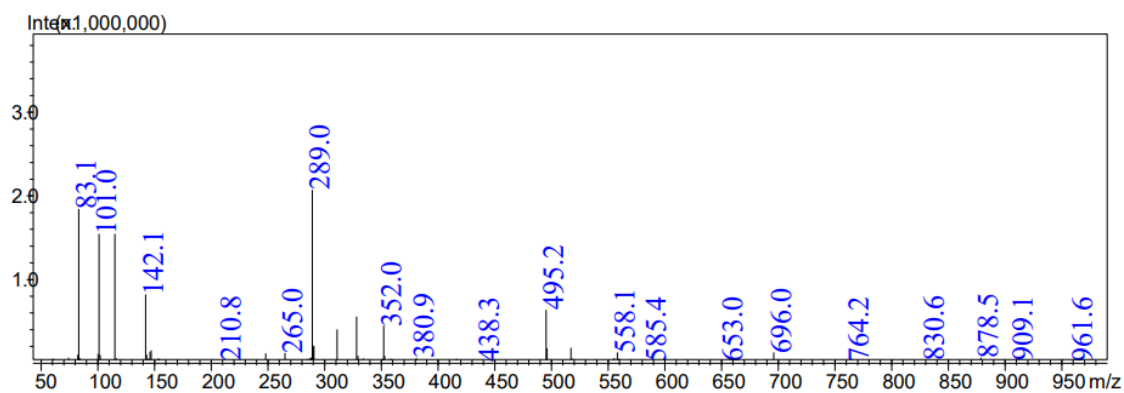
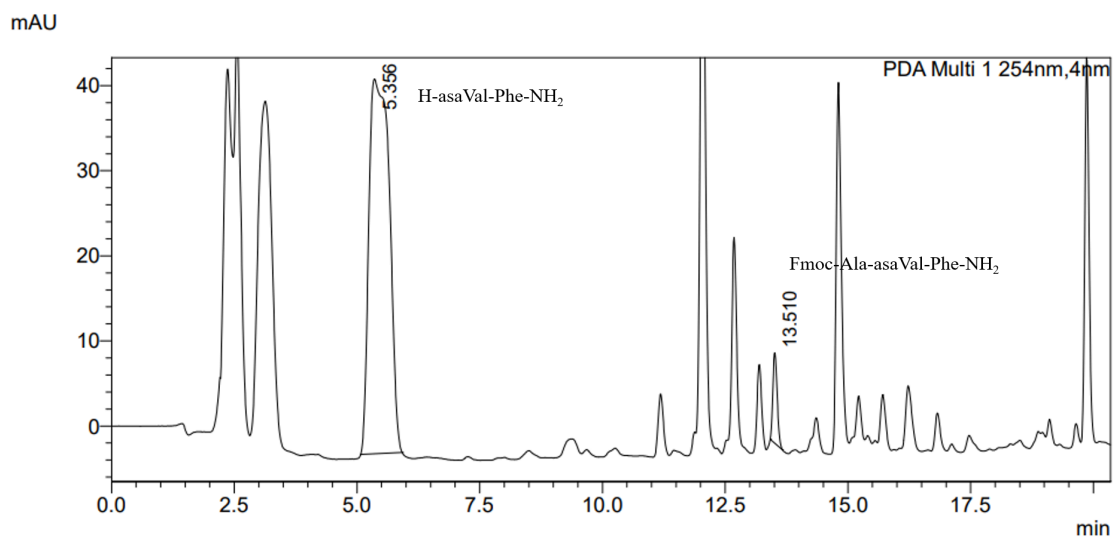
Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



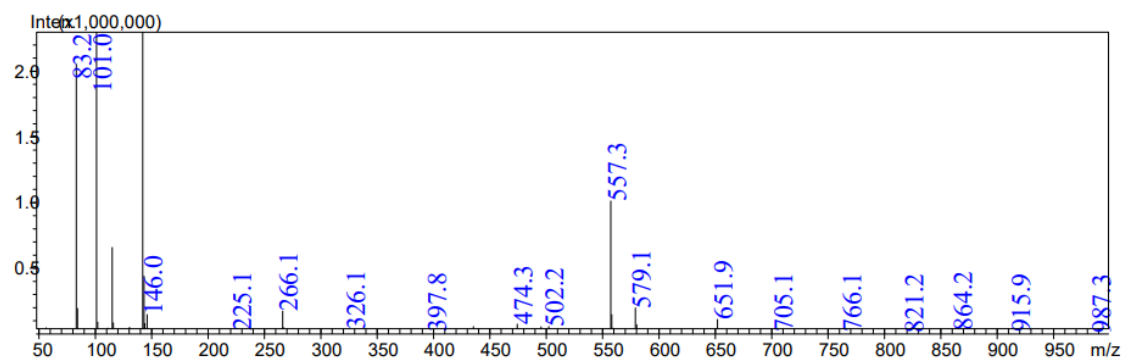
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z

Lisa 13. Ala sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 24 h; aktivaatoriks TCFH.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



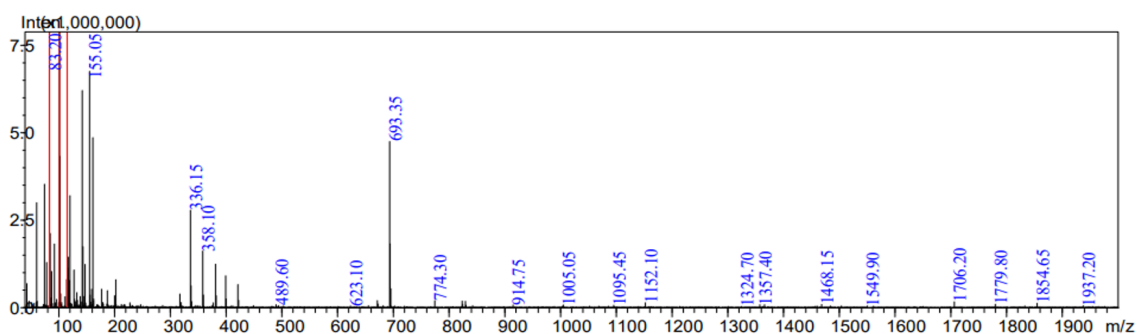
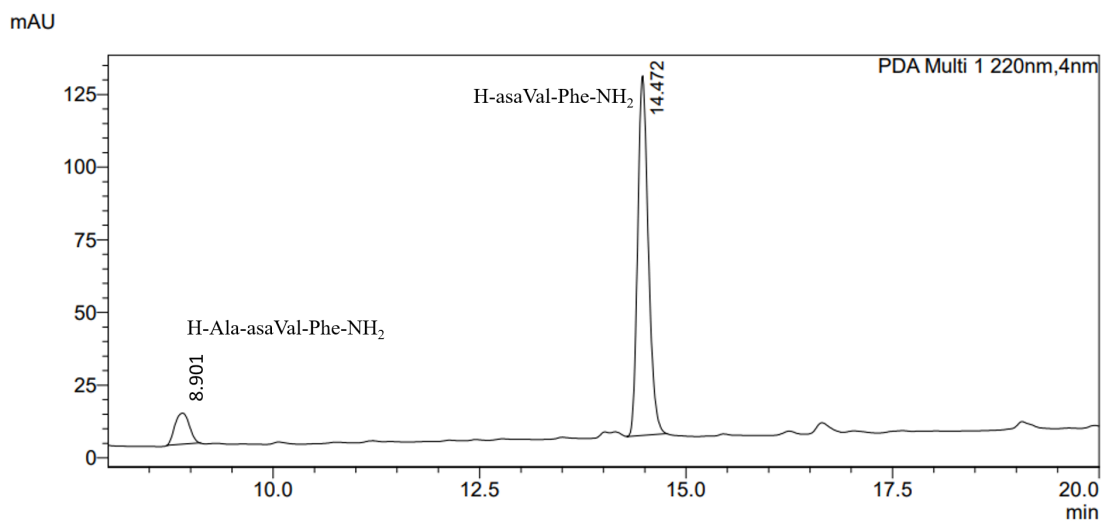
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z



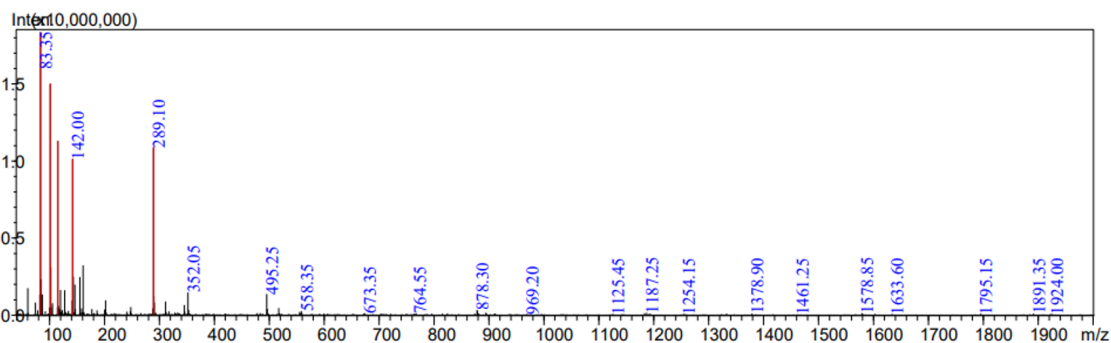
Fmoc-Ala-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 557 m/z

Lisa 14. Ala sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 15 min; aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



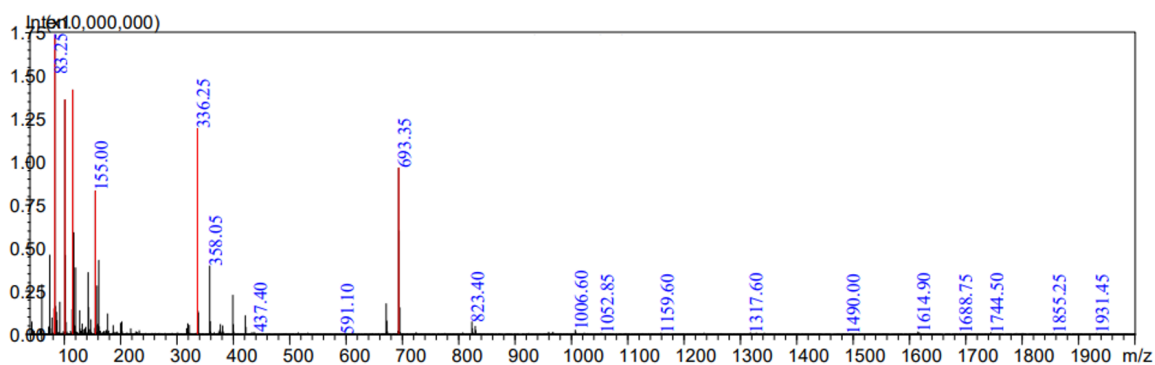
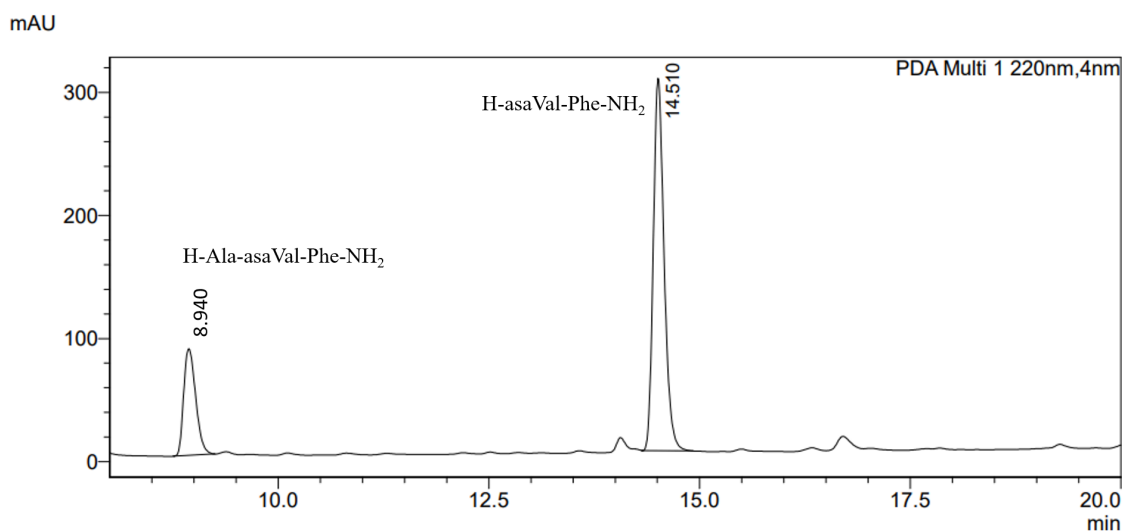
H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 336 m/z; [M+Na] = 358 m/z; [2M+Na] = 693 m/z



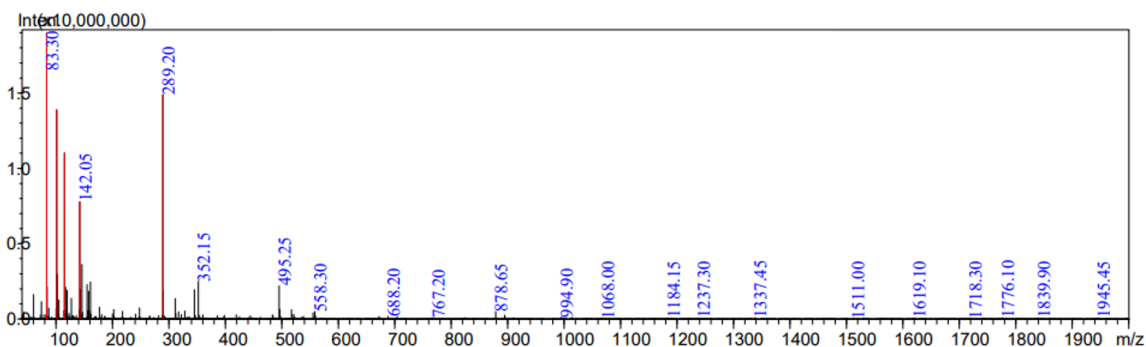
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z

Lisa 15. Ala sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 3 h; aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



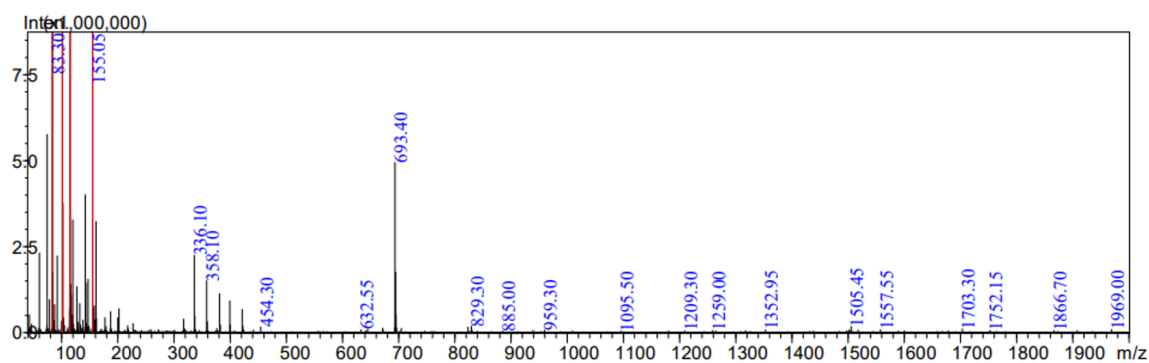
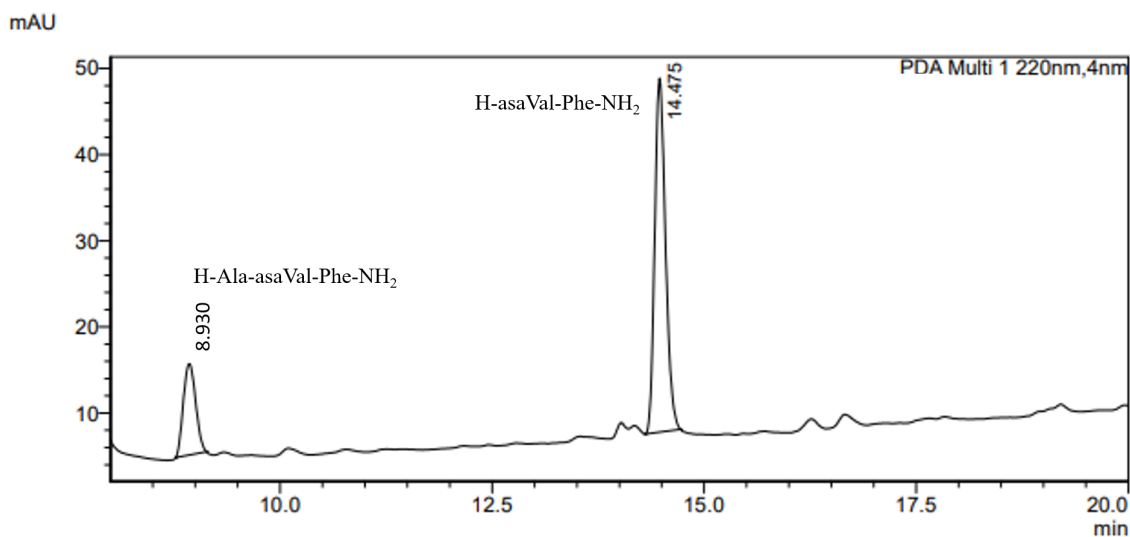
H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 336 m/z; [M+Na] = 358 m/z; [2M+Na] = 693 m/z



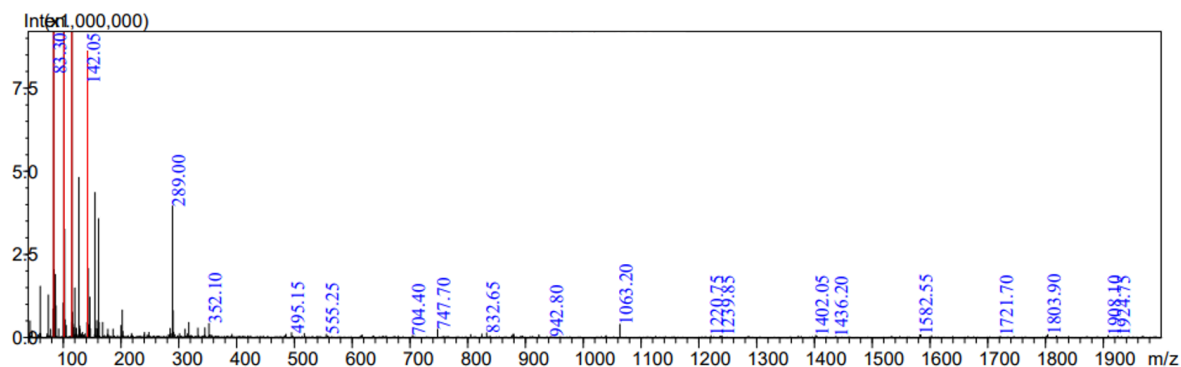
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z

Lisa 16. Ala sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 24 h; aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



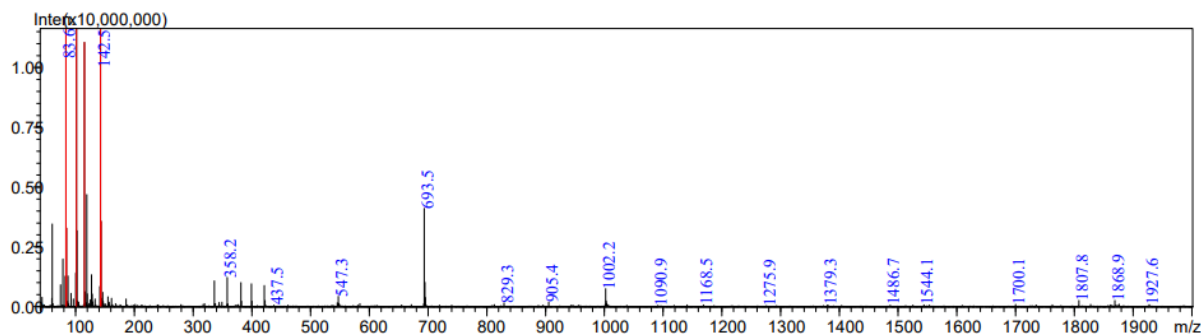
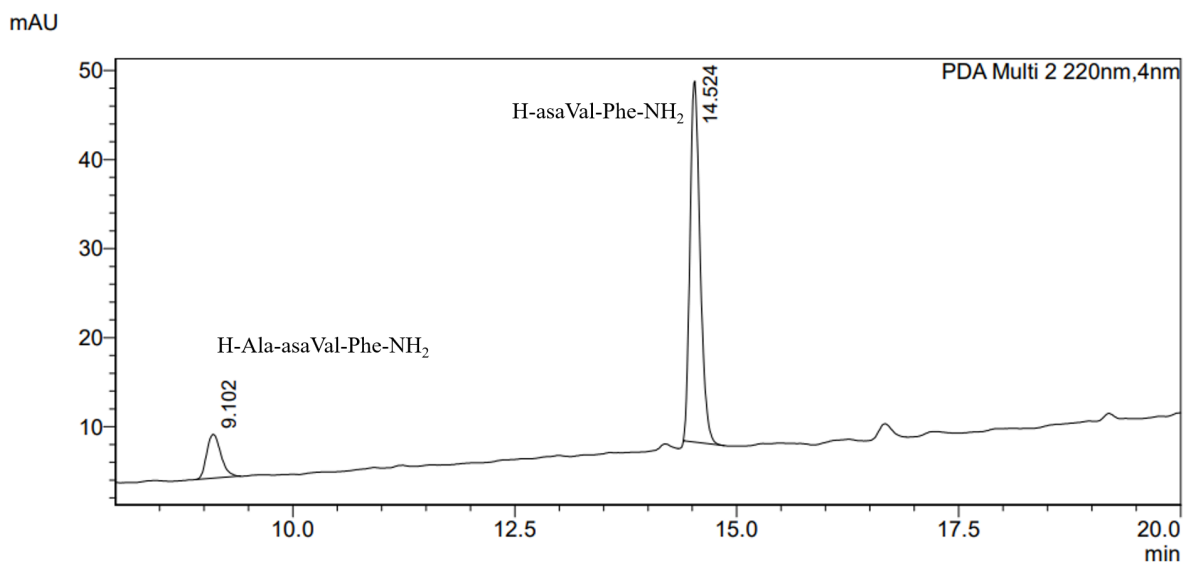
H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 336 m/z; [M+Na] = 358 m/z; [2M+Na] = 693 m/z



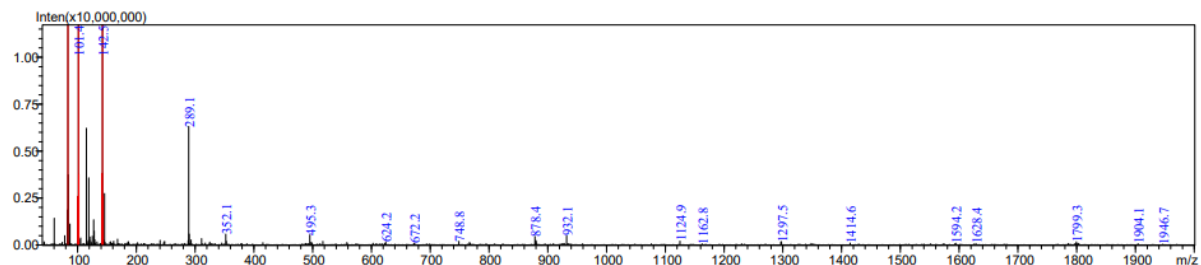
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z

Lisa 17. Ala sidumise etapi korduskatse kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ala-asaVal-Phe-NH₂; 24 h; aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 70%.



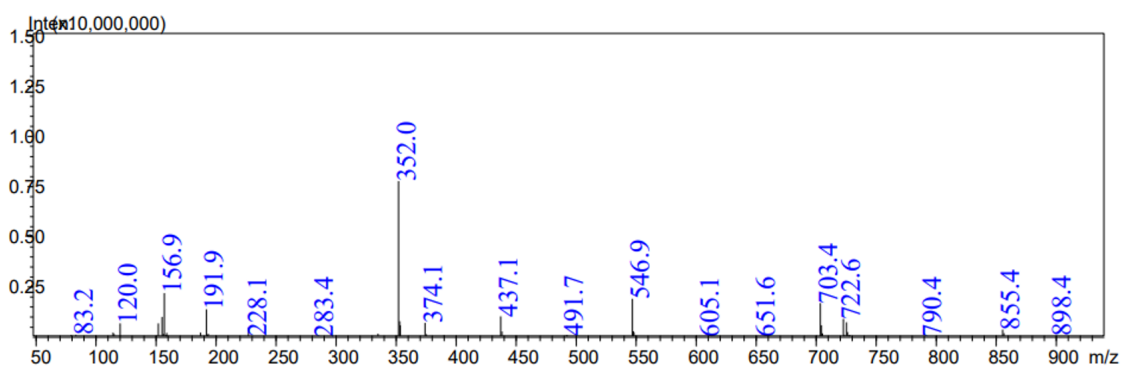
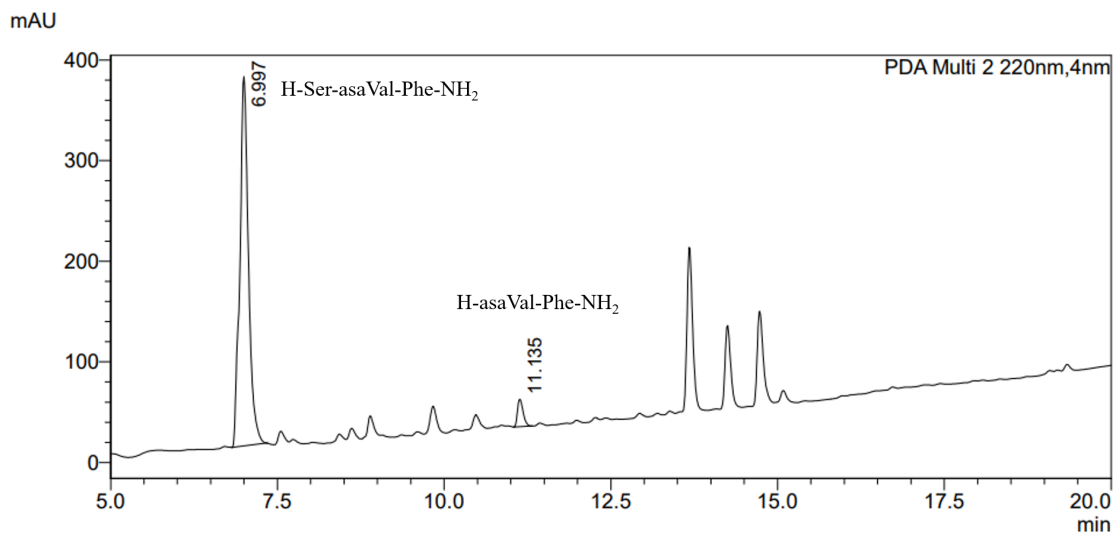
H-Ala-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 338 m/z; [2M+Na] = 693 m/z



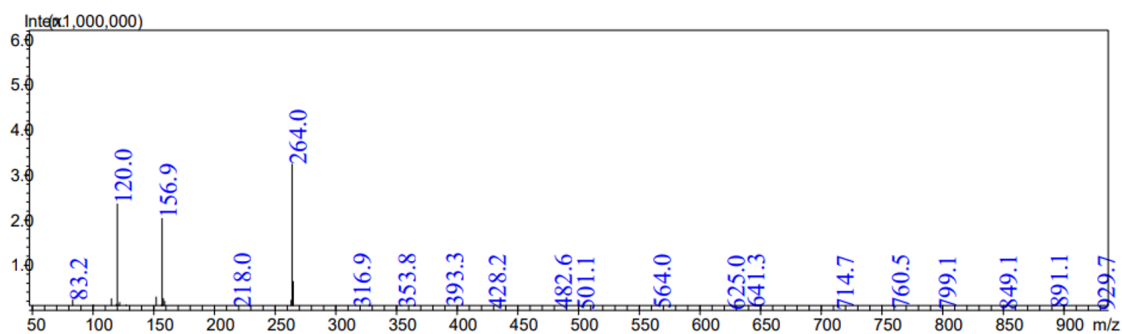
H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+Na] = 289 m/z

Lisa 18. Ser sidumise etapi kromatogramm ja massispekter mudelpeptiidis H-Ser-asaVal-Phe-NH₂; 24 h; aktivaatoriks Ghosez reagent.

Proov lahustati 5% ACN lahuses ja voolutati 19 min voolukiirusel 1 ml/min. Puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Gradiendiprogramm (B lahus): 5 – 80%.



H-Ser-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 352 m/z



H-asaVal-Phe-NH₂ massispekter. [M+H] = 264 m/z

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Cynthia Noormets,

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

„Asa-valiini sisaldavate asa-peptiidide süntees“,

mille juhendajad on Anu Ploom (PhD) ja Alla Troska-Palla (MSc),

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

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

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

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

Cynthia Noormets

Tartu 28.05.2024