

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppiseaduste valdkond
Keemia instituut

Alla Troska

Asa-arginiini sisaldavate asa-peptiidide süntees

Magistritöö (30 EAP)
Keemia

Juhendajad: Anton Mastitski, PhD

Anu Ploom, PhD

Tartu 2019

Asa-arginiini sisaldavate asa-peptiidide süntees

Peptidomimeetikud, sh asa-peptiidid on peptiidi analoogid, millel on vastava peptiidi omadused, kuid on pikema elueaga elusorganismis. Asa-peptiidide bioloogiliste omaduste laiemaks uurimiseks puuduvad aga efektiivsed sünteesimeetodid. Töö eesmärgiks oli sünteesida PKA „miinimumsubstraadi“ RRASVA asaArg analoogid. Asa-aminohapped ei ole püsivad ning nende lisamiseks peptiidijärjestusse kasutatakse prekursoritena hüdrasiini derivaate. Töö tulemusena täiendati meie töögrupis välja töötatud ja arendati ka alternatiivset asaArg prekursori sünteesimeetodit, mida kasutati asaRASVA sünteesimiseks tahke faasi sünteesi meetodil. AsaArg sisaldava mudel asa-peptiidiga viidi läbi ka kineetiline uurimus asa-peptiidsideme moodustumise efektiivsuse iseloomustamiseks kasutades selleks meie töögrupis välja töötatud meetodit. Selgus, et vastavate uuringute läbiviimiseks on meetodit vaja kohandada *N*-terminaalset asaArg sisaldavate asa-peptiidide jaoks, kuid saadud informatsiooni põhjal järeldati, et asaArg-le järgmise aminohappe sidumise sünteesimeetod vajab veel edasi arendamist, et sünteesida asa-analoogi RasaRASVA mõistliku saagisega.

Märksõnad: Asa-arginiin; Asa-peptiidid; Hüdrasiini derivaadid; Kineetika; RRASVA; SPSS
Orgaaniline keemia – P390

Synthesis of aza-arginine containing aza-peptides

Peptidomimetics, including aza-peptides are peptide analogues that preserve properties of a parent peptide but have longer lifetime in living organism. Aza-peptide biological properties are not extensively studied as there are no effective synthesis methods. The aim of this work was to synthesize PKA “minimum substrate” RRASVA azArg analogues. Aza-amino acids are not stable; hence the hydrazine derivatives are used as precursors for aza-peptide synthesis. As a result of this work, the synthesis method for azArg precursor developed by our research group, were improved as well as the alternative method has been elaborated. The synthesized azArg precursors were used for azRRASVA preparation by solid phase peptide synthesis method as well in azArg containing model aza-peptide synthesis, which were used for kinetic study to characterize the effectiveness of aza-peptide bond formation reaction in this compound. It was concluded that the available method for azArg semicarbazide terminus acylation needs to be improved before synthesis of RazRASVA peptide aza-analogue in moderate yields.

Keywords: Aza-arginine; Aza-peptides; Hydrazine derivatives; Kinetics; RRASVA; SPSS
Organic chemistry – P390

Sisukord:

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1 Peptiidid ja nende süntees	8
1.2 Asa-peptiidid ja nende süntees.....	10
1.2.1 Asa-aminohapete prekursorite süntees.....	11
1.2.1.1 Asa-arginiini prekursori süntees.....	12
1.2.1.2 Asa-aminohappe lisamine peptiidijärjestusse.....	14
1.2.2 Aminohappe sidumine asa-aminohappe N-terminaalsele otsale.....	15
1.3 Proteiinkinaas A miinimumsubstraadid	16
2. Eksperimentaalne osa.....	18
2.1 Sünteeside kirjeldused	18
2.1.1 Asa-arginiini prekursori süntees eeskirja järgi [12].....	18
2.1.1.1 Fmoc-hüdrasiini süntees.....	18
2.1.1.2 N-Boc-3-bromopropüülamiini süntees	19
2.1.1.3 N-Fmoc-N'-(3-N''-Boc-propüül)hüdrasiini süntees	19
2.1.1.4 N-Fmoc-N'-(3-N ^ω ,N' ^ω -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini süntees	20
2.1.2 Asa-arginiini prekursori sünteesi alternatiivne sünteesirada.....	20
2.1.2.1 N,N'-di-Boc-S-metüülisotiourea süntees [46]	20
2.1.2.2 β-alaniini metüülestri hüdrokloriidi süntees.....	21
2.1.2.3 Metüül-3-(N ^ω ,N' ^ω -di-Boc-guanidüül)propanaadi süntees [36,47]	21
2.1.2.4 3-(N ^ω ,N' ^ω -di-Boc-guanidüül)propanaali süntees.....	22
2.1.2.5 N-Fmoc-N'-(3-N ^ω ,N' ^ω -di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini süntees	22
2.1.3 H-AsaRRASVA-NH ₂ ja H-asaRF-NH ₂ süntees	23
2.1.3.1 H-asaRRASVA-NH ₂ tahkelt kandjalt eemaldamine ning puhastamine	24
2.1.3.2 Asa-arginiini N-terminaalse otsa atsüülimise reaktsiooni kineetilised mõõtmised	25
3. Tulemused ja arutelu	26
3.1. Asa-arginiini prekursori süntees.....	26
3.1.1 Asa-arginiini süntees läbi asa-orniitini.....	26
3.1.2 Asa-arginiini prekursori alternatiivse sünteesiraja väljatöötamine	28
3.1.3 H-asaRRASVA-NH ₂ süntees	31
3.1.4 Asa-peptiidideme moodustumine mudelpeptiidis H-AasaRF-NH ₂	33
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY.....	37
Kasutatud kirjandus.....	38
Tänuavaldus	43

<i>LISAD</i>	<i>44</i>
---------------------------	------------------

Kasutatud lühendid

<u>Lühend</u>	<u>Eestikeelne nimetus</u>	<u>Ingliskeelne nimetus</u>
Ac	Atsetüül	Acetyl
ACN	Atsetonitriil	Acetonitrile
AH	Aminohape	Amino acid
AIDS	Immuunpuudulikkuse sündroom	Acquired immune deficiency syndrome
Ala, A	Alaniin	Alanine
Alk	Alküül	Alkyl
Ar	Arüül	Aryl
Arg, R	Arginiin	Arginine
Bn	Bensüül	Benzyl
Boc	<i>Tert</i> -butoksükarbonüül	<i>Tert</i> -Butoxycarbonyl
BTC	Bis(triklorometüül)karbonaat	Bis(trichloromethyl) carbonate
cAMP	Tsükliline adenosiinmonofosfaat	Cyclic adenosine monophosphate
COMU	(1-Tsüano-2-etoksü-2-oksooetülideenaminooksü)dimetüülaminomorfolino-karbeenium heksafluorofosfaat	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylaminomorpholino-carbenium hexafluorophosphate
DCM	Diklorometaan	Dichloromethane
Ddz	α,α -Dimetüül-3,5-dimetoksübensüüloksükarbonüül	α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl
DIBAL-H	Diisobutüülalumiiniumhüdriid	Diisobutylaluminium hydride
DiPEA	<i>N,N</i> -diisopropüületüülamiin	<i>N,N</i> - diisopropylethylamine
DMAP	4-Dimetüülaminopüridiin	4-Dimethylaminopyridine
DMF	Dimetüülformamiid	Dimethylformamide
EA	Etüülatsetaat	Ethyl acetate
Fmoc	9-Fluorenüülmetoksükarbonüül	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Gly	Glütsiin	Glycine
Hex	Heksaan	Hexane
HOBt	1-Hüdoksübensotriasool	1-Hydroxybenzotriazole

HPLC	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia	High-performance liquid chromatography
KT	Kaiseri test	Kaiser test
MBHA	4-Metüülbenshüdrüülamiin	4-Methylbenzhydramine
MS	Massispektromeetria	Mass spectrometry
NMP	<i>N</i> -metüül-2-pürrolidoon	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
Ph	Fenüül	Phenyl
Phe, F	Phenüülalaniin	Phenylalanine
PKA	Proteiinkinaas A	Protein kinase A
PyBop	Bensotriasool-1-üül- oksütripürrolidinofosfoonium heksafluorofosfaat	Benzotriazol-1-yl- oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
PyOxim	[Etüülsüano(hüdroksüimino)atsetato- O ₂]tri-1-pürrolidinüülfosfoonium heksafluorofosfaat	[Ethylcyano(hydroksüimino)acetate- O ₂]tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate
RRASVA	Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala	Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala
Ser	Seriin	Serine
SARS	Raskekujuline äge respiratoorne sündroom	Severe acute respiratory syndrome
SPPS	Tahke faasiline peptiidsüntees	Solid-phase peptide synthesis
TBTU	<i>O</i> -(bensotriasool-1-üül)- <i>N,N,N',N'</i> - tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> - tetramethyluronium tetrafluoroborate
tBU	<i>Tert</i> -butüül	<i>Tert</i> -butyl
TEA	Trietüülamiin	Triethylamine
Tf	Trifüül	Trifyl
TFA	Trifluoroetaanhape	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahüdrofuraan	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropüülsilaan	Triisopropylsilane
TLC	Õhukese kihi kromatograafia	Thin-layer chromatography
TMR	Tuumamagnetresonants	Nuclear magnet resonants
TMS	Tetrametüülsilaan	Tetramethylsilane
TMSCl	Trimetüülklorosilaan	Trimethylchlorosilane
UV-Vis	Ultraviolet – nähtav	Ultraviolet – visible
Val	Valiin	Valine

Sissejuhatus

Peptiidid on aminohapetest koosnevad biopolümeerid, millest osa omab suurt bioloogilist aktiivsust ja reguleerib suurt hulka biokeemilisi protsesse. Mõningaid peptiide kasutatakse ravimites, kuid nende kui toimeainete suurimaks puuduseks on kiire ensümaatiline lagunemine elusorganismis. Selle probleemi lahendamiseks on arendatud peptidomimeetikuid, mis säilitavad algse peptiidi omadusi, kuid on stabiilsemad, selektiivsemad ning omavad sageli suuremat bioloogilist aktiivsust.[1–6] Üheks peptidomimeetikute rühmaks on asa-peptiidid, kus vähemalt ühes aminohappejäägis on α -süsinik asendatud lämmastikuga [7,8]. Asa-peptiidide bioloogilist aktiivsust ei ole väga palju uuritud, kuna nende süntees on mitmel põhjusel komplitseeritud. Asa-aminohapped ei ole stabiilsed ega kommertsiaalselt kättesaadavad ja vajavad hüdrasiini derivaatidest prekursorite valmistamist [9]. Samuti on asa-peptiidide saagised madalad või reaktsioonid ei toimu üldse, kui kasutada asa-peptiidsideme sünteesiks tavalist tahke faasi sünteesi (SPPS) protokoll. Meie uurimisgrupis töötatakse välja efektiivsemat asa-peptiidsünteesi protokoll arendades nii asa-aminohapete prekursorite kui ka asa-peptiidide sünteesimetoodikaid.

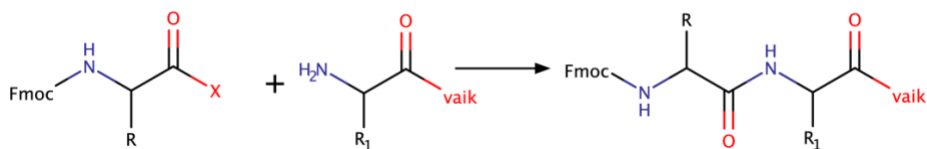
Antud töö eesmärgiks on sünteesida proteiinkinaas A lühima substraadi RRASVA asa-analoogid asaRRASVA ning võimaluse korral ka RasaRASVA, kasutades asa-peptiidsideme moodustamiseks aktivaatorit COMU, mida pole varasemalt asa-peptiidide sünteesimiseks kasutatud. Aminohapete asendamine vastavate asa-aminohapetega annaks võimaluse uurida asenduse mõju substraadi sidumise afiinsusele ja fosforüleerimisreaktsiooni efektiivsusele, kuna on teada, et peptiidi peaahtelas tehtavad muudatused seda mõjutavad.[10,11] Vastavate peptiidi asa-analoogide sünteesimiseks on vaja esmalt sünteesida asa-arginiini e asaArg prekursori meie töögrupis välja töötatud meetodi järgi [12]. AsaArg prekursori sünteesimeetodid pole veel täiuslikud ning nende kõrvale on vaja arendada ka uusi sünteesimeetodeid. Asa-peptiidi RasaRASVA efektiivsemaks sünteesimiseks on vajalik eelnevalt teostada ka asaArg ja järgneva aminohappe vahel toimuva reaktsiooni kineetilised uuringud, et veenduda aktivaator COMU sobivuses vastava substraadi sünteesimiseks. Bakalaureusetöö raames ning meie töögrupi saadud tulemuste põhjal on teada, et aminohappe liitumine asa-aminohappe *N*-terminaalsele otsale kõige efektiivsemate testitud aminohappe aktivaatoritega COMU ja PyOxim on siiski ~30 korda aeglasem võrreldes aminohappe *N*-terminaalse otsale liitumisega [13,14]. Hiljuti selgus ka, et nii asa-aminohappe kui ka sellele järgneva aminohappe kõrvalrühma steeriline takistus mõjutab oluliselt asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni kiirust ja saagist [15].

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Peptiidid ja nende süntees

Peptiidid on aminohappejääkidest koosnevad ühendid, mis sageli omavad bioloogilist aktiivsust. Seetõttu on need heaks alternatiiviks paljudele igapäevases elus kasutatavatele ainetele, sh inim- ja loomaravimiteks [16]. Näiteks kasutatakse neid nii suhkruasendajates (dipeptiid aspartaam) kui ka hormonaalsetes preparaatides (oksütotsiin).[17,18]

Peptiidid koosnevad vähemalt kahest aminohapest, mis on omavahel seotud amiid- ehk peptiidsidemetega (**Skeem 1**). Aminohapetel on nii amino- kui ka karboksüülrühm, mis vajavad peptiidsünteesis vastavalt kaitsmist ja aktiveerimist.[19]



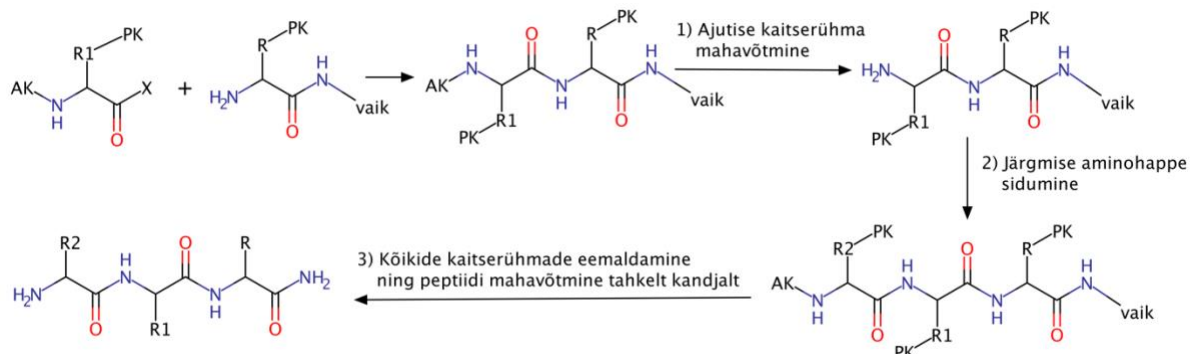
Skeem 1. Peptiidsideme teke SPPS meetodiga, kus R/R₁ on külgrühmad ja X on lahkv rühm.

Aktiveerimine on peptiidsünteesis oluline samm, sest aminohappe karboksüülrühm ja aminorühm ei ole piisavalt reaktsioonivõimelised. Tänu –COOH rühma aktiveerimisele toimub aminohappe sidumine vähemalt tunni jooksul. Lisaks on mõnel aminohappel reaktsioonivõimeline külgrühm, mille tõttu tuleb neis kasutada kahte tüüpi kaitserühmi: püsivat ja ajutist. Püsiv kaitserühm on seotud aminohappe külgrühmale ja püsib seal terve peptiidi sünteesi jooksul ning ajutine rühm on seotud aminohappe N-terminaalsele otsale ja on selektiivselt mahavõetav.[17]

Peptiidsünteesiks kasutatakse kahte meetodit: vedel- ja tahke faasi sünteesi (SPPS) [18]. Mõlema meetodi põhimõte seisneb esimese aminohappe kaitsmises ning kõigi järgnevate aminohapete viimase aminohappe külge sidumises. Vedelfaasi sünteesi puhul muudetakse esimese aminohappe karboksüülne ots (C-terminaalne ots) estriks, mis ei reageeri antud tingimustes aminohappega, ning SPPS puhul kinnitatakse aminohape vaigu külge. SPPS puhul on vaiguks lahustumatu polümeer, tavaliselt MBHA amiid või Wang vaik, mis püsib peptiidi küljes kuni sünteesi lõpuni.[20]

Laboratoorses tingimustes kasutatakse enamasti SPPS meetodit, nn Merrifieldi meetodit (**Skeem 2**).[21] Antud meetod on mugav, selle kasutamine tagab kõrgeid saagiseid ning on ka automatiseeritud, kuid vajab suuri solventide koguseid ning reagentide ülehulka. See strateegia seisneb esimese aminohappe sidumises vaigu külge, sellele järgneb ajutise kaitserühma

aminohappelt eemaldamine ja aminohappe sidumise etappide kordamine vastavalt vajalikule aminohappejääkide järjestusele. Kui peptiidijärjestus on valmis, eemaldatakse kõik kaitserühmad, nii ajutine kui ka püsivad, ning peptiid võetakse tahkelt kandjalt maha. Seejärel on peptiidi vaja puhastada, sest sünteesi jooksul tekib ka erinevaid kõrvalprodukte.



Skeem 2. Tahkefaasiline peptidisüntees, kus R ja R(1,2) on aminohapete külghelad, AK ja PK on vastavalt ajutine ja püsiv kaitserühm ning X on lahkuv rühm.

SPPS-is tuntakse kahte põhilist strateegiat: Fmoc/tBu ja Boc/Bn meetodid. Boc/Bn meetodi puhul nii püsivad kui ka ajutised kaitserühmad vajavad mahavõtmiseks happelisi tingimusi (Boc-rühm saab eemaldada TFA-ga, kuid Bn-rühm vajab teisi tingimusi, nt vedela HF kasutamist, hüdrokeenimist), mille tõttu võib peptiid olla kahjustatud/osaliselt lagunenu sünteesi käigus.[18] Fmoc/tBu strateegia puhul sellist probleemi ei esine, kuna Fmoc (ajutine kaitserühm) võetakse selektiivselt maha pehmetes aluselistes tingimustes kasutades 20% piperidiin/DMF lahust.[22] Ülejäänud kaitserühmad saab eemaldada kasutades TFA-l (83-95%) põhinevad segusid, millele on lisatud kõrvalreaktsioone ennetavaid aineid (vesi, TIS, tioanisool, etaanditool jms) [17].

SPPS meetodi suurimaks puuduseks on mittetäieliku kaitserühma eemaldamise ja järgmise aminohappe sidumise etapid. Seetõttu suurema sidumistsükli arvu läbinud proovis, esineb tavaliselt palju vale aminohappejärjestusega peptiide. Lisaks võib pika peptiidi puhul peptiidi tahkelt kandjalt mahavõtmiseks kasutatav TFA peptiidi osaliselt lagundada. Seetõttu sõltuvad peptiidi saagised oluliselt aminohappejääkide järjestusest ning peahela pikkusest.[22]

Peptidisünteesi on aastate jooksul palju edasi arendatud. Tänapäeval osatakse vältida nii epimerisatsiooni kui ka suurema osa kõrvalproduktide teket, millega tagatakse kõrged sidumisreaktsioonide saagised. Aminohapete aktivaatoreid on väga lai valik ning see rida täieneb pidevalt.[23,24] Antud saavutused on võimaldanud sünteesida bioaktiivseid peptiide,[18] kuid nende rakendamine ravimites on üsna tagasihoidlik. Peptiidide peamiseks puuduseks on kiire ensümaatiline lagunemine elusorganismis, mitteselektiivne sidumine

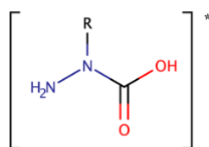
retseptoritega ning madal biosaadavus. Nende omaduste parandamiseks töötatakse välja peptidomimeetikuid, mille põhimõte on säilitada algse peptiidi vajalikud omadused olles samal ajal vastupidavam organismis.[1] Peptidomimeetikud jagatakse kolmeks rühmaks [6]:

- I tüüp – struktuuril põhinevad mimeetikud, mis on peptiidile sarnase struktuuriga ning omavad samu funktsioone ensüümi või retseptoriga interakteerumisel vastavas ruumilises orientatsioonis,
- II tüüp – funktsioonidel põhinevad mimeetikud, mille struktuur ei ole peptiidiga sarnane, kuid ensüümi või retseptoriga interakteerumisel käitub mimeetik peptiidiga analoogselt,
- III tüüp – nii struktuuril kui ka funktsioonidel põhinevad mimeetikud, mille molekuli skelett erineb peptiidist, kuid omab kõiki vajalikke funktsionaalseid rühmi bioloogiliseks interakteerumiseks vastavas ruumilises orientatsioonis.

Peptiidide modifitseerimiseks ja stabiilsuse tõstmiseks on palju võimalusi, sh L-aminohapete asendamine D-aminohapetega; β -aminohappejääke sisaldavate peptiidide kasutamine, kus vähemalt üks aminohappejääk on ühe süsiniku võrra pikem jne. Veel üks tänapäeval huvipakkuv mimeetikute liik on asa-peptiid, mida vaadeldakse põhjalikumalt järgmises osas (1.2).[5–7]

1.2 Asa-peptiidid ja nende süntees

Asa-peptiidid on peptidomimeetikud, kus üks või enam α -süsinikest on asendatud lämmastikuga. Antud muutus vähendab $-(NR)CO-$ karbonüülrühma elektrofiilsust ja α -asendi geometria muutub tetraedrilisest trigonaalplanaarseks elimineerides kiraalsuse (**Skeem 3**).[25]



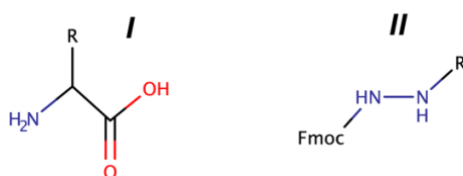
Skeem 3. Asa-aminohappe üldine struktuur (*ebastabiilne vorm).

Esimesed tulemused bioloogiliselt aktiivsete asa-peptiidide uuringute kohta avaldati 1963. aastal, mis viis asa-peptiidide laiema uurimiseni [8]. Tulemused on näidanud, et asa-peptiidideme olemasolu muudab peptiidi bioloogiliselt aktiivsemaks, tõstab selektiivsust, muudab peptiidi vastupidavamaks proteolüüsi suhtes ning pikendab peptiidi eluiga organismis. Tänu sellistele omadustele kasutatakse asa-peptiide retseptorite ligandidena, ensüümide

inhibiitoritena, ravimitena ja ravimi eellastena.[2–5,7,26] Uuringute põhjal on need potentsiaalsed AIDS-i, hepatiidi ja SARS-i ravimikandidaadid.[27–29]

1.2.1 Asa-aminohapete prekursorite süntees

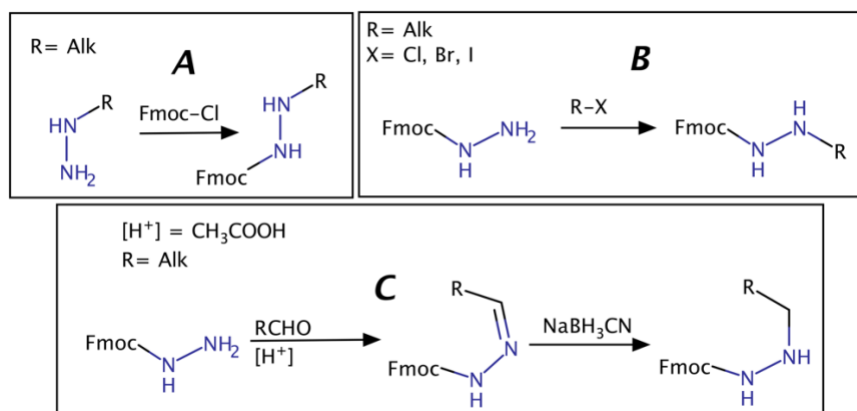
On väidetud, et asa-peptiidide süntees on väga sarnane peptiidikeemiaga,[30] kuid tegelikult on need strateegiad üsna erinevad. Esiteks ei ole asa-aminohapped stabiilsed. Seega on asa-peptiidide valmistamise üheks võimaluseks viia süntees üle asa-aminohappe prekursori (**Skeem 4, II**), milleks on kaitstud hüdrasiini derivaat [3].



Skeem 4. Aminohappe **I** vs asa-aminohappe prekursori **II** üldised struktuurid.

Asa-aminohappe prekursorid pole kommertsiaalselt kättesaadavad ning nende kasutamisel sünteesis on probleemiks hüdrasiini derivaatide mürgisus ja piiratud säilivusaeg.

Prekursorite sünteesiks kasutatakse põhiliselt kolme meetodit (**Skeem 5**): 1) alküülitud hüdrasiini kaitsmist vastava kaitserühmaga **A**, 2) hüdrasiini ja selle derivaatide otsest alküülimist **B** ning 3) redutseerivat hüdrasiini alküülimist **C**.



Skeem 5. Asa-aminohapete prekursorite sünteesi põhilised meetodid.

Meetodi **A** korral ostetakse vajalik monoalküülhüdrasiin ning üks lämmastiku aatom kaitstakse sobiva kaitserühmaga. See on kiire meetod prekursori saamiseks, kuid sellel on mitu puudust. Esiteks omavad ainult vähesed müügil olevad alküülitud hüdrasiinid aminohapetele vastavaid külgrühmasid ehk ainult üksikud asa-aminohapete prekursorid on sellisel viisil valmistatavad. Teiseks puuduseks on kaitserühma sidumisetapi mitteselektiivsus. Olenevalt alküülrühmast muutub lämmastike nukleofiilsus ja kaitsmise reaktsioon toimub nii primaarse kui ka sekundaarse *N*-aatomiga. Seetõttu tekib enamasti kahe produkti segu. Varieerides

reaktsioonitingimusi, nagu temperatuur ja aeg, võib saagist tõsta. Võimalik on selektiivselt kaitsta alküülhüdrasiini alküülitud lämmastik ning siduda Fmoc-rühm vaba hüdrasiinse lämmastiku külge. Seejärel on võimalik esimene kaitserühm selektiivselt eemaldada ja tulemuseks saada monokaitstud monoalküülhüdrasiin.[31]

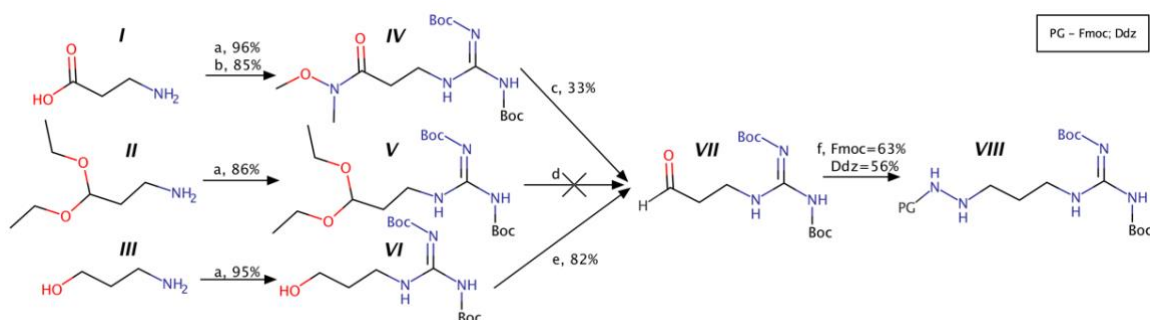
Meetodite **B** ja **C** korral alustatakse sünteesi tavaliselt monokaitstud (Fmoc-, Boc-, Z) hüdrasiini valmistamisest. Seetõttu on meetodil **B** e otsesel alküülimisel kokku kaks etappi ning redutseerival alküülimisel **C** kolm etappi. Otsene alküülimine on mugav sünteesimeetod, kuid ka sellel esineb puudusi, nt peale ühe alküülrühma sidumist võib reaktsioon edasi minna andes nii monoalküülitud kui ka di- ja tri-alküülhüdrasiini. Monokaitstud alküülhüdrasiini monoalküülitud lämmastiku nukleofiilsus kasvab donoorse efekti tõttu, misjärel muutub see aktiivsemaks reagentiks kui monokaitstud hüdrasiin.[32]

Selliste kõrvalproduktide tekkimist on võimalik suuremas osas vältida kasutades Fmoc-hüdrasiini vähemalt kolmekordses ülehulgas. Redutseeriva alküülimise **C** korral on sünteesirada pikem ning lisaks sellele ei ole reaktsiooni käigus moodustuv hüdrasoon alati stabiilne ühend.[9] Hüdrasooni redutseerimiseks kasutatakse enamasti happelist keskkonda ning NaBH_3CN , mis on mõõdukalt stabiilne protoonses keskkonnas nõrga happe juuresolekul. Reaktsioon antud tingimustes kulgeb väga kiiresti ja selektiivselt [33].

Mitme asa-aminohappe prekursori süntees (nt asa-alaniini) on hästi optimeeritud, kuid osade asa-aminohapete prekursorite sünteesil esineb veel puudusi, nt on lähteained, vaheühendid ja produktid väga tundlikud reaktsiooni keskkonna suhtes, tihti kasutatakse reagentide suuri ülehulkasid ning läbiviidavad reaktsioonid on sageli temperatuuritundlikud.[9,12,34,35]

1.2.1.1 Asa-arginiini prekursori süntees

AsaArg prekursori **VIII** võimalikke sünteesiradu on kirjeldanud Freeman *et al.* artklis (**Skeem 6**), kus prooviti prekursorit sünteesida kolmest erinevast lähteainest **I**, **II** ja **III** arendades kolme sünteesirada, kuid neist õnnestus lõpuni viia kaks [36].

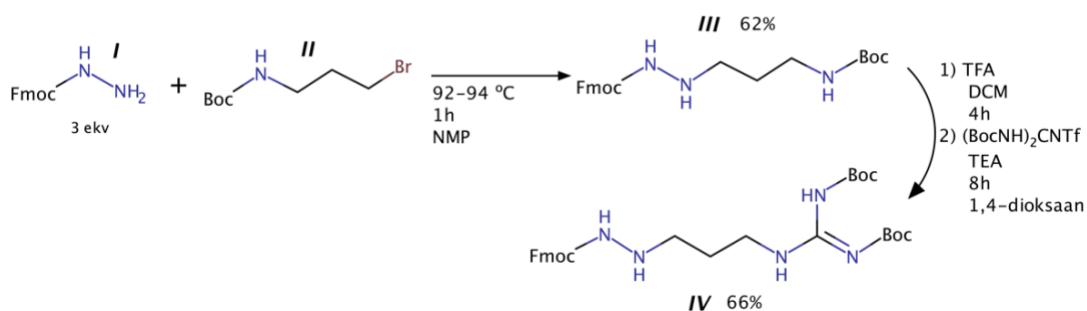


Skeem 6. AsaArg sünteesi alternatiivsed sünteesirajad, kus PG on kaitserühm (Fmoc või Ddz).

Skeemil 6 kasutatud reagentid: a) *N,N'*-di-Boc-metüülisotiourea, DMAP; b) *N,O*-dimetüülhüdrosülamiin hüdrokloriid, PyBop, DiPEA; c) LiAlH_4 ; d) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$; e) Dess-Martin periodinaan; (f) 1) PG-NH-NH_2 , seejärel 2) NaBH_3CN , AcOH

Freeman *et al.* poolt sünteeside läbiviimisel esines mitmeid probleeme. Esiteks andis 3-(di-Boc)guanidüülpropaanhappe Weinreb amiidi **IV** redutseerimine (c) LiAlH_4 abil keskpärased saagised ning lisaks oli produkt raskesti puhastatav. Teiseks ei andnud aldehyüdi **VII** saamine vastava 3-(di-Boc)guanidinopropanaal dietüülatsetaadi **V** hüdrolüüsi teel (d) oodatud tulemusi. Kolmandaks ei õnnestunud esialgu 3-(di-Boc)guanidüülpropanooli **VI** oksüdeerimine kasutades erinevaid oksüdeerijaid sõltumata alkoholi puhtusastmest. Lõpuks saadi aldehyüd **VII** kasutades reaktsiooni Dess-Martin periodinaaniga (e), kuid produkti töötlemisel NaHCO_3 ja $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ vesilahuste segus muutus produkti struktuur intramolekulaarse tsükliatsiooni tõttu, mille käigus eemaldus Boc-kaitserühm. Selleks, et vältida happe jääkide esinemist reaktsioonisegus, teostati Dess-Martini reaktsioon seejärel püridiinis, mille tulemusena toimus alkoholi täielik oksüdatsioon. Saadud aldehyüdist sünteesiti *asaArg* prekursor **VIII**, mida kasutasid nad järgnevalt ka *asa*-peptidisünteesis.

AsaArg prekursori sünteesimiseks on ka meie töögrupis arendatud ning optimeeritud sünteesirada, mis põhineb *asa*- β^3 -arginiini sünteesi meetodil [37]. Selle protseduuri kohaselt muudetakse Fmoc-kaitstud hüdrasiin **I** *asa*-ornitiini prekursoriks **III** kuumutades monokaitstud hüdrasiini **I** NMP-s *N*-Boc-3-bromopropüülamiiniga **II** (Skeem 7). Seejärel eemaldatakse *asa*-ornitiini prekursorilt **III** TFA abil Boc-kaitserühm ning külghela lämmastikku guanidileeritakse *N,N'*-di-Boc-*N''*-trifüülguanidiini abil, mille tulemusel saadakse produktiks *asaArg* prekursor **IV**. [12]



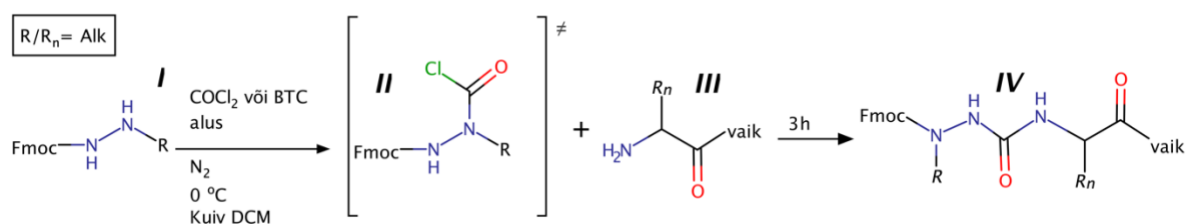
Skeem 7. *AsaArg* prekursori süntees üle *asa*-ornitiini.

Antud meetodi eeliseks võrreldes eelmiste sünteesiteedega on kaheetapiline sünteesirada. Olenevalt etapist on eeltoodud sünteesi saagised kvantitatiivsetest headeni. Kasutatavad reagentid on üsna hästi kättesaadavad ning nende valmistamine ei tekita raskusi. Seega on olemas mitu *asaArg* prekursori sünteesimeetodit, kuid vaatamata sellele on vaja veel täiustada

olemasolevaid meetodeid või arendada alternatiivseid sünteesimeetodeid, mis oleksid mugavamalt ja lihtsamalt teostatavad ning samal ajal tagaksid kõrged saagised.

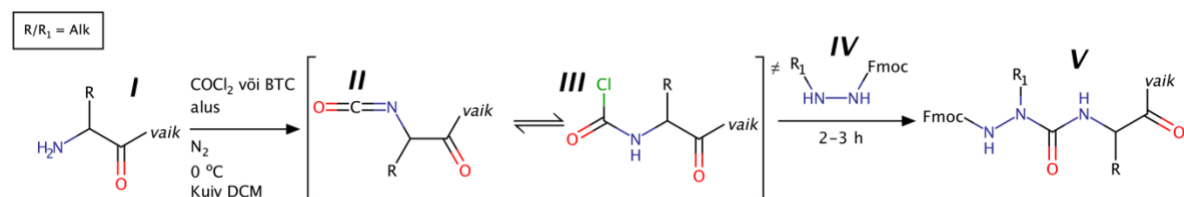
1.2.1.2 Asa-aminohappe lisamine peptiidijärjestusse

Asa-peptiidi valmistamiseks on vaja muuta asa-aminohappe prekursor reaktsioonivõimeliseks asa-aminohappe derivaadiks. Tavaliselt toimub see etapp inertse gaasi keskkonnas, kuivas solvendis ning madala temperatuuri juures, et vältida kõrvalreaktsioonide kulgemist. Asa-aminohappe aktiveerimiseks on olemas mitu meetodit. Esimese kohaselt muudetakse hüdrasiini derivaat **I** fosgeeni või trifosgeeni (BTC) abil aktiivseks klooranhüdriidiks **II** ja seotakse eelneva aminohappe *N*-terminaalse otsaga **III** (**Skeem 8**) [3].



Skeem 8. Asa-aminohappe prekursori sidumine peptiidi üle asa-aminohappe klooranhüdriidi.

Teiseks prekursori sidumise meetodiks on fosgeeni või BTC abil aminohappe **I** *N*-terminaalse otsa aktiveerimine, muutes selle aktiivseks isotsüanaadiks **II**, mis on tasakaalus klooranhüdriidiga **III**, ning seejärel prekursori **IV** sidumine otse alküülitud monokaitstud hüdrasiini kujul (**Skeem 9**) [25,38].

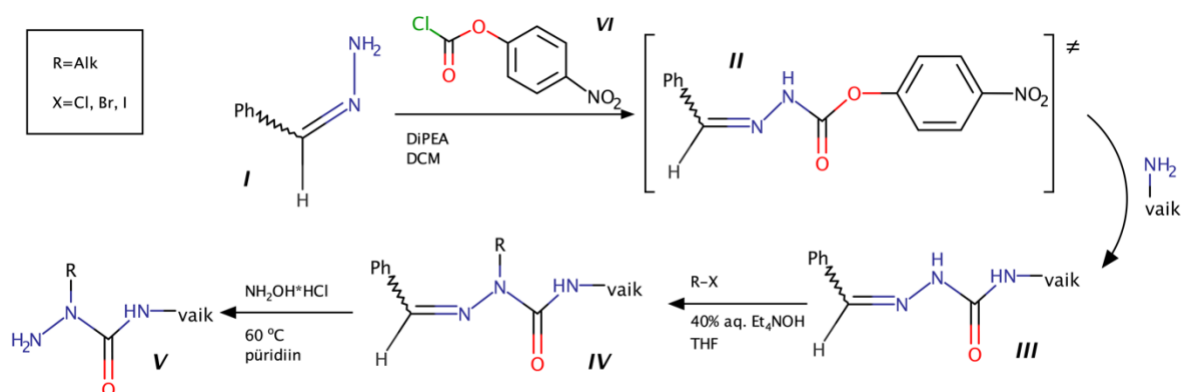


Skeem 9. Asa-aminohappe prekursori sidumine peptiidi muutes aminohappe *N*-terminaalse otsa aktiivseks isotsüanaadiks.

Mõlema meetodi korral on reaktsiooni läbiviimiseks kasutatud samu tingimusi ja reagente, seega puudused on üldiselt samad. Kasutades aktivaatorina fosgeeni ja selle analooge, muutub aine üliaktiivseks ühendiks, mistõttu tekib reaktsioonisegusse palju kõrvalprodukte.

Aktiveerimisreaktsiooni läbiviimisel madalal temperatuuril ning veevabas keskkonnas on kõrvalproduktide teket võimalik vähendada, kuid mitte täielikult elimineerida. Lisaks on isotsüanaatse meetodi (**Skeem 9**) korral oht, et peptiidi isotsüanaatne ots tsükliiseerub.[25]

Asa-aminohappe prekursori lisamiseks peptiidijärjestusse on olemas ka kolmas lähenemisviis (**Skeem 10**).[39,40]



Skeem 10. Asa-peptiidi süntees kasutades para-nitrofenüüloksükarbonüül rühmaga aktiveeritud bensaldehüüdi hüdrasooni

Selle kohaselt teostatakse bensaldehüüdi hüdrasooni **I** reaktsioon para-nitrofenüülkloroformaadiga **VI** ning seejärel seotakse aktiveeritud karbonüülrühmaga *N*-bensaal-*N'*-para-nitrofenüüloksükarbonüül hüdrasiin **II** aminohappega. Selle tulemusel saadakse kaitstud asa-peptiid **III**. Järgmises etapis atsüülitud hüdrasiini lämmastik alküülitakse ja saadakse ühend **IV**. Reaktsioon kulgeb selektiivselt atsüülitud hüdrasiini lämmastikuga, kuna ta on ühelt poolt karboksüleeritud ning teiselt poolt on üle -N=CH- rühma seotud aromaatsse tuumaga, mille tulemusel tekib ulatuslik konjugatsioon. Selline struktuur teeb vastava lämmastikuga seotud H-aatomi tugevalt happeliseks ning loob võimaluse selektiivseks deprotoneerimiseks tugeva aluse (trietüülammooniumhüdrosiidi) toimel. Seejärel eemaldatakse hüdrasoonne kaitserühm hüdroksüülamiin hüdrokloriidi abil moodustades bensaldehüüd oksüimi ning saadakse vaba hüdrasino-terminaalse otsaga asa-peptiid **V**. Selles meetodis ei kasutata fosgeeni või selle analooge, kuid antud puhul viiakse alküülrühm aminohappejäägi külge, mis on peptiidi küljes.

1.2.2 Aminohappe sidumine asa-aminohappe *N*-terminaalsele otsale

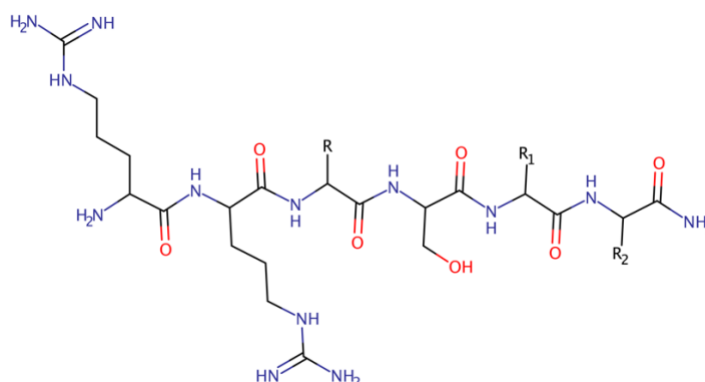
Asa-aminohappe korral ei ole *N*-terminaalne ots nii reaktsioonivõimeline kui aminohappe puhul ning asa-aminohappe semikarbasiidse NH₂-NR-C(O) otsa atsüülimine on aeglasem ja kulgeb madalate saagistega. Vähenenud reaktsioonivõime on seletatav α -aminohappe ja selle asa-derivaadi nukleofiilsuste erinevusega,[41] kuid enamasti ei võeta seda arvesse ning asa-aminohappele järgmise aminohappe sidumiseks kasutatakse enamasti tavalist SPPS protokoll.[4,6,42] Hiljuti testiti meie uurimisgrupis asa-mudelpeptiidis H-Ala-asaAla-Phe-NH₂ kvantitatiivselt mõnede enamlevinud SPPS aktivaatorite [43] rakendatavust asa-

peptiidsideme moodustamiseks.[14] Tulemused näitasid, et asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni kiirus ja saagis sõltuvad aktivaatori struktuurist. Testitud aktivaatoritest on efektiivseimad COMU ja PyOxim, kuid Ala sidumine asaAla külge toimub siiski ~30 korda aeglasemalt võrreldes vastava peptiidsideme sünteesiga.

Lisaks selgus, et erinevalt tavapeptiidsünteesist, mõjutab külgrühma steeriline takistus oluliselt asa-peptiidsünteesis aminohappe sidumise reaktsiooni kiirust eelnevale asa-aminohappele [15]. Näiteks reageerib COMU-ga aktiveeritud Gly asaAla-ga ~28 korda kiiremini kui Val. Hiljuti on meie teadusgrupis asa-mudelpeptiidis H-Ala-asaAH-Phe-NH₂ testitud ka mõnede asa-aminohapete külgrühmade steerilist mõju asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni efektiivsusele. Esialgsed tulemused näitavad, et asa-aminohappe külgrühma steeriline takistus mõjutab asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni kiirust ning saagist veelgi olulisemal määral kui sellele liituvat aminohappe külgrühma steeriline efekt (avaldamata andmed). Seega on endiselt vaja asa-peptiidide sünteesimeetodeid edasi arendada, mis võimaldaksid asa-aminohappe *N*-terminaalse otsa efektiivsemat atsüülimist.

1.3 Proteiinkinaas A miinimumsubstraadid

Miinimumsubstraat on cAMP-sõltuva proteiinkinaas A (PKA) katalüütilise alaühiku poolt ära tuntav peptiid.[44] Teiste sõnadega on see minimaalse aminohappejääkide arvuga bioloogiliselt aktiivne peptiid, mis on vajalik fosforüleemisreaktsiooni toimumiseks organismis. Uuringud PKA sünteetiliste miinimumsubstraatidega on näidanud, et fosforüleerimisreaktsiooni efektiivsus cAMP-sõltuva proteiinkinaasi toimel sõltub aminohappejääkide järjestusest peptiidis. Kõik miinimumsubstraadid sisaldavad arginiini, kuid fosforüleerimine on efektiivsem miinimumsubstraatidega, mille struktuuris on kaks arginiini järjestikku ja fosforüleeritav seriin ühe aminohappejäägi kaugusel (**Skeem 11**).[45]



Skeem 11. PKA miinimumsubstraadi RRXSXX üldine struktuur, kus R/R₁/R₂ on alküülrühmad.

Varasemalt on meie teadusgrupis sünteesitud erinevaid RRASVA α - β^3 -derivaate.[11,44] ning uuritud nende fosforüleerimist PKA poolt. Tulemused näitasid, et α - β^3 -aminohappega asendamine peptiidis parandab seostumist PKA sidumiskohaga võrreldes asendamata peptiidiga, samas fosforüleerumisreaktsiooni efektiivsus väheneb. Teades, et muudatused peptiidi peaahtelas mõjutavad substraadi fosforüleerimisreaktsiooni PKA toimel, on üheks võimaluseks asendada RRASVA-s aminohappeid vastavate α -aminohapetega ning võrrelda tulemusi nii modifitseerimata substraatidega kui ka α - β^3 -derivaatidega saadud andmetega. Tulemused võivad avada uusi vaatenurki peptidomimeetiliste ligandide disainimiseks. Seni ei ole vastavate α -derivaatide fosforüleerimist uuritud, kuna olemasolevate meetoditega ei õnnestunud neid sünteesida.

2. Eksperimentaalne osa

Töös kasutatavad reagentid ja solventid on ostetud Sigma-Aldrichist, Lachnerist, Honeywellist või Merckist. Kõiki kuivatatud reagente ja solvente hoiti suletuna lämmastiku atmosfääris.

TLC analüüsid viidi läbi silikageeliga kaetud alumiiniumfooliumil (poori suurus 60 Å, osakeste läbimõõt 9,5 – 11,5 µm), ilmutatud UV 254 nm indikaatoriga. Laigud visualiseeriti UV-kiirguse abil (254 nm) ning lisaks kasutati happelist KMnO₄ lahust. Kolonnkromatograafia tahke faasina kasutati silikageeli poori suurusega 60 Å ja osakeste läbimõõduga 63 – 200 µm. TMR mõõtmiseid teostati Bruker Avance-III 700 MHz ja Bruker Avance-II 200 MHz spektromeetril.

HPLC-MS analüüsid viidi läbi Shimadzu LCMS-2020 instrumendil kasutades Phenomenex Kinetex 5 µM EVO kolonni (C₁₈, 100 Å, 250 x 4.6 mm) 220 nm juures ning kasutades UV-Vis ja massidetektorit. Proovide voolutamiseks kasutati järgmiseid puhvreid: puhver A oli 0,1% TFA/Milli-Q ja puhver B oli 0,1% TFA/ACN. Proove voolutati 19 min jooksul voolukiirusel 1 ml/min. Proovid süstiti teisel minutil ning andmete töötluks kasutati programmi LabSolutions Version 5.82 SP1.

AsaRRASVA puhastati Shimadzu HPLC-20AD kromatograafia 220 nm juures, kasutades Phenomenex Luna 5 µM pöördfaaskolonni (C₁₈(2), 100 Å, 250 x 15 mm). Proovide voolutamisel kasutati järgmist gradiendi programmi: puhver B 7 – 20%, kus puhver A oli 0,1% TFA/MilliQ ja puhver B oli 0,1% TFA/ACN. Toorpeptiidi voolutati 20 min jooksul voolukiirusega 5 ml/min. Andmeid analüüsiti programmiga LabSolutions Version 5.82 SP1.

2.1 Sünteeside kirjeldused

2.1.1 Asa-arginiini prekursori süntees eeskirja järgi [12]

2.1.1.1 Fmoc-hüdrasiini süntees

Viaali kaaluti 80% hüdrasiin hüdraati (12,1 ekv; 5,7 g; 0,143 mol) ja viidi üle 500 ml ümarkolbi. Kolb täideti N₂-ga. Lisati 20 ml ACN:H₂O (dest.) 1:1 lahust N₂ keskkonnas ja jahutati jäävannis 0 °C-ni. Seejärel kaaluti Fmoc-Cl (1,0 ekv; 3,05 g; 11,8 mmol), lahustati ACN-is (200 ml) ning kanti üle tilklehtrisse. Süsteem suleti septumiga, isoleeriti N₂ õhupalliga ning hakati tilkhaaval lisama Fmoc-Cl lahust (1 tilk/2 sek). Pärast lahuse lisamist lasti reaktsioonil käia 0,5 h toatemperatuuril. Seejärel eemaldati solvent rotaatoraurusti abil ≤ 40 °C juures, asetati kolb jäävanni, lisati ainele külma dest. H₂O-d (50 ml) ja hoiti jäävannil 10 min.

Saadud aine filtriti välja klaasfiltri abil, pesti külma dest. H₂O-ga (3x15 ml) ja toluleeniga (3x15 ml). Ainet kuivatati ööpäev õhu käes ning seejärel vakumeeriti lüofilisaatori abil.

Saagis: 94%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 1 ja Lisa 2.

¹H TMR (700 MHz, DMSO-d₆, δ): 8,36 (s, 1H, NH); 7,88 (d, J= 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,69 (d, J= 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,41 (t, J= 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,33 (t, J= 7 Hz, 2H, Ar(H)); 4,29 (d, J= 7 Hz, 2H, CH₂(Fmoc)); 4,21 (t, J= 7 Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4,08 (s, 2H, NH₂).

¹³C TMR (700 MHz, DMSO-d₆, δ): 158,2; 143,8; 140,7; 127,7; 127,1; 125,2; 120,1; 65,7; 46,7.

2.1.1.2 *N-Boc-3-bromopropüülamiini süntees*

Ümarkolbi kaaluti 3-bromopropüülammooniumbromiidi (1,0 ekv; 1,53 g; 6,99 mmol). Di-*tert*-butüüldikarbonaat (1,0 ekv; 1,50 g; 6,87 mmol) kaaluti viaali ning lahustati DCM-is (20 ml). Seejärel lisati di-*tert*-butüüldikarbonaadi lahus kolbi ning hakati tilkhaaval lisama pidevalt segades DiPEA (2 ekv; 1,77 g; 13,69 mmol). Reaktsioonil lasti toimuda üleöö.

Seejärel lahjendati reaktsioonisegu EA-ga, pesti küllast. NaHCO₃ lahusega ning dest. veega. Orgaanilist kihti pesti küllast. NaCl lahusega, kuivatati vv (veevaba) Na₂SO₄-ga ja roteeriti kokku.

Saagis: 93 %, TMR spektrid on vastavalt Lisa 3 ja Lisa 4.

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 4,67 (s, 1H, NH); 3,44 (t, J= 7 Hz, 2H, CH₂); 3,27 (t, J= 7 Hz, 2H, CH₂); 2,05 (quint, J= 7 Hz, 2H, CH₂); 1,45 (s, 9H: 3 x CH₃(Boc)).

¹³C TMR (700 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 156,0; 79,5; 39,0; 32,7; 30,8; 28,4.

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

5 ml ümarkolbi kaaluti Fmoc-hüdrasiin (**vt 2.1.1.1**) (3,0 ekv; 1,45 g; 5,70 mmol). Viaali kaaluti *N*-Boc-3-bromopropüülamiini (**vt 2.1.1.2**) (1,0 ekv; 0,45 g; 1,89 mmol) ning lisati Fmoc-hüdrasiinile. Seejärel täideti kolb N₂ ning reaktsioonisegu lahustati dest. NMP-s (3,84 ml; Lisa 19, a), mida kuumutati 92 °C juures 1 h. Seejärel jahutati segu toatemperatuurini, lahjendati EA-ga ning pesti küllast. NaHCO₃ lahusega. Orgaanilist kihti pesti küllast. NaCl lahusega, kuivatati vv Na₂SO₄-ga ja roteeriti kokku ≤ 40 °C juures. Toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades eluendina EA-d.

Saagis: 40%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 5 ja Lisa 6.

¹H TMR (700 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 7,75 (d, J=7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,57 (d, J=7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,38 (t, J=7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,29 (t, J=7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 6,59 (s, 1H, NH); 4,92 (s, 1H, NH); 4,43 (s, 2H, CH₂(Fmoc)); 4,2 (s, 1H, CH(Fmoc)); 3,2 (s, 2H, CH₂); 2,90 (s, 2H, CH₂); 1,62 (s, 2H, CH₂); 1,44 (s, 9H: 3 x CH₃(Boc)).

^{13}C TMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$, δ): 157,3; 156,1; 143,7; 141,3; 127,8; 127,1; 125,0; 120,0; 79,2; 67,0; 49,4; 47,2; 38,5; 28,4; 27,7.

2.1.1.4 *N-Fmoc-N'-(3-N^o,N^o-di-Boc-guanidüülpropüül)hüdrasiini süntees*

N-Fmoc-N'-(3-N''-Boc-propüül)hüdrasiin (1,0 ekv; 746 mg; 1,88 mmol) lahustati DCM-is (4 ml), lahus jahutati 0 °C-ni ja lisati TFA-d (8 ml). Segati 15 min antud temperatuuril ning seejärel lasti reaktsioonil käia 4 h toatemperatuuril. Reaktsioonisegu kontsentreeriti rotaatoraurustil ning eemaldati TFA jäägid lüofilisaatori abil. Produktiks saadi *N-Fmoc-N'-3-aminopropüülhüdrasiin**2TFA.

Saadud toorprodukt ja *N,N'*-di-Boc-*N''*-trifüülguanidiin (1,0 ekv; 710 mg; 1,81 mmol) lahustati 1,4-dioksaanis (9 ml) ning lisati DiPEA (4,0 ekv; 938 mg; 7,25 mmol). Reaktsioonil lasti toimuda toatemperatuuril segades 14 h. Saadud toorprodukt puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades eluendina EA:Hex 1:1.

Saagis: 80%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 7 ja Lisa 8.

^1H TMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$, δ): 11,51 (s, 1H, NH); 8,55 (s, 1H, NH); 7,75 (d, $J = 7$ Hz, 2H, Ar(H)); 7,57 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ar(H)); 7,39 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ar(H)); 7,29 (t, $J = 7$ Hz, 2H, Ar(H)); 6,83 (s, 1H, NH); 4,43 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 4,22 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 3,52 (s, 2H, CH_2); 2,95 (s, 2H, CH_2); 1,72 (s, 2H, CH_2); 1,49 (s, 9H: 3 x $\text{CH}_3(\text{Boc})$); 1,48 (s, 9H: 3 x $\text{CH}_3(\text{Boc})$).

^{13}C TMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$, δ): 163,5; 157,4; 156,1; 153,3; 143,7; 141,3; 127,7; 127,1; 125,0; 120,0; 83,1; 79,3; 66,9; 48,8; 47,2; 38,8; 28,3; 28,1; 26,8.

2.1.2 Asa-arginiini prekursori sünteesi alternatiivne sünteesirada

2.1.2.1 *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiouurea süntees [46]

250 ml ümarkolbi kaaluti *S*-metüüliouurea hemisulfaat (1,0 ekv; 2,53 g; 18,18 mmol), lisati küllast. NaHCO_3 lahus (50 ml) ja DCM (25 ml). Seejärel lisati segades di-*tert*-butüüldikarbonaadi (1,5 ekv; 5,81 g; 26,61 mmol) lahus DCM-is (25 ml). Reaktsioonil lasti toimuda toatemperatuuril N_2 keskkonnas 47 h jooksul intensiivselt segades.

Pärast segamist eeltoodud aja jooksul kanti segu jaotuslehtrisse, eraldati kihid ning veefaasi ekstraheeriti (2 x 10 ml) DCM-iga. Seejärel ühendati kõik orgaanilised faasid, millele lisati (25 ml) küllastunud NaHCO_3 lahust. Kaaluti *S*-metüüliouurea hemisulfaat (0,2 ekv; 0,55 g; 3,95 mmol), mis lahustati küllast. NaHCO_3 lahuses (25 ml) ning lisati reaktsioonisegule. Reaktsioonil lasti toimuda toatemperatuuril N_2 keskkonnas 48 h intensiivse segamise juures. Seejärel kanti reaktsioonisegu jaotuslehtrisse ning eraldati kihid. Veefaasi ekstraheeriti (2 x 10

ml) DCM-iga, orgaanilised kihid ühendati ning pesti (2 x 40 ml) küllast. NaCl lahusega, kuivatati vv Na₂SO₄-ga ning eemaldati solvent rotaatoraurusti abil. Aine puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades alguses voolutina toluen:EA 9:1 segu, seejärel Hex:EA 3:1 segu.

Saagis: 67%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 9 ja Lisa 10.

¹H TMR (200 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 11,59 (s, 1H, NH); 2,40 (s, 3H, S(CH₃)); 1,52 (s, 18H: 6 x CH₃(2 x Boc)).

¹³C TMR (700 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 171,6; 28,0; 27,9; 14,5.

2.1.2.2 *β*-alaniini metüülestri hüdrokloriidi süntees

Kaalutud β-alaniini hüdrokloriidile (1,0 ekv; 10,30 g; 82,0 mmol) lisati MeOH (85 ml). Seejärel lisati tilkhaaval destilleeritud TMSCl (2,0 ekv; 17,82 g, 164,0 mmol), misjärel kuumutati reaktsioonisegu 5 h tagasijooksutemperatuuril. Reaktsiooni lõpetamiseks lasti segul jahtuda ning roteeriti kokku. Tekkinud valget sadet pesti tolueniga (3 x 50 ml) ning vakumeeriti.

Saagis: 100%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 11 ja Lisa 12.

¹H TMR (200 MHz, D₂O, δ): 3,75 (s, 3H, O(CH₃)); 3,30 (t, J= 6,2 Hz, 2H, CH₂); 2,83 (t, J= 6,4 Hz, 2H, CH₂).

¹³C TMR (700 MHz, D₂O, δ): 173,1; 52,6; 35,1; 31,0.

2.1.2.3 Metüül-3-(*N*^ω,*N*^{ω'}-di-Boc-guanidüül)propaadi süntees [36,47]

β-alaniini metüülestri hüdrokloriidi (**vt 2.1.2.2**) (1,5 ekv; 1,80 g; 12,89 mmol) kaaluti 100 ml kolbi, lahustati DMF-is (12 ml) ja lisati DiPEA (2,5 ekv; 2,78 g; 21,50 mmol). *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea (1,0 ekv; 2,50 g; 8,60 mmol) (**vt 2.1.2.1**) lahustati soojendades DMF-is (25 ml) ja lisati reaktsioonisegule. Reaktsioonil lasti toimuda 20 h N₂ keskkonnas.

Reaktsiooni peatamiseks roteeriti DMF kokku ²/₃ ulatuses ning lahjendati EA:küllast. NaHCO₃ 1:1 (80 ml) segus. Orgaanilist faasi pesti dest. H₂O-ga (1 x 30 ml), küllast. NaCl lahusega (1 x 30 ml) ning kuivatati vv Na₂SO₄. Produkt puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades voolutina Hex:EA 3:1 segu.

Saagis: 87%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 13 ja Lisa 14.

¹H TMR (200 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 11,47 (s, 1H, NH); 8,73 (s, 1H, NH); 3,72 (q+s, J= 1,8 Hz, 5H: CH₂+O(CH₃)); 2,62 (t, J= 1,8 Hz, 2H, CH₂); 1,50 (s+s, 2 x 9H: 6 x CH₃(2 x Boc)).

¹³C TMR (700 MHz, CDCl₃+TMS, δ): 172,4; 163,4; 156,2; 153,0; 83,1; 79,4; 51,9; 36,2; 33,8; 28,3; 28,1.

2.1.2.4 3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propaali süntees

Läbikuumutatud ja N_2 täidetud kolvis valmistati metüül-3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propaadi (vt 2.1.2.3) (1,0 ekv; 883 mg; 2,59 mmol) lahus tolueenis (15 ml). Reaktsioonikolb varustati N_2 täidetud õhupalliga, jahutati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ni ning süstla abil lisati reaktsioonisegule 1,2 M DIBAL-H lahust tolueenis (1,3 ekv; 2,66 ml; 3,20 mmol). Reaktsioonil lasti toimuda 12 min. Reaktsiooni peatamiseks lisati tilkhaaval MeOH (11 ml) ja segati toatemperatuuril 1 h. Seejärel lahustati segu EA-s (120 ml). Orgaanilist faasi pesti küllast. NaHCO_3 lahusega (1 x 120 ml), dest. H_2O (2 x 120 ml), küllast. NaCl lahusega (1 x 120 ml) ja kuivatati vv Na_2SO_4 abil. Solvent eemaldati rotaatoraurusti abil ning aine puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades eluendina Hex:EA 3:1.

Saagis: 39%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 15 ja Lisa 16.

^1H TMR (200 MHz, CDCl_3 +TMS, δ): 11,44 (s, 1H, NH); 9,83 (s, 1H, CHO); 8,58 (s, 1H, NH); 3,74 (q, $J=6\text{ Hz}$, 2H, CH_2); 2,79 (t, $J=6\text{ Hz}$, 2H, CH_2); 1,49 (s+s, 2 x 9H: 6 x CH_3 (2 x Boc)).

^{13}C TMR (700 MHz, CDCl_3 +TMS, δ): 200,6; 163,5; 156,2; 153,0; 83,2; 79,3; 43,5; 34,1; 28,3; 28,0.

2.1.2.5 N-Fmoc-N'-(3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propüül)hüdrasiini süntees

Läbikuumutatud ja N_2 täidetud kolvis valmistati Fmoc-hüdrasiini (1,0 ekv; 253 mg; 0,997 mmol) suspensioon kuivas THF-is (1 ml). Seejärel lisati reaktsioonisegusse 3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propaali (1,0 ekv; 314 mg; 0,997 mmol) lahus kuivas THF-is (1,4 ml). Reaktsioonikolb varustati N_2 täidetud õhupalliga ning reaktsioonil lasti toimuda üks ööpäev. Seejärel kontsentreeriti reaktsioonisegu rotaatoraurusti abil ning lahustati uuesti kuivas THF-is (8 ml). Sellele lisati veel NaBH_3CN (4,0 ekv; 251 mg; 3,987 mmol) ja AcOH (0,3 ekv; 170,1 μL ; 0,299 mmol). Reaktsioonil lasti käia üks ööpäev. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil kasutades voolutina EA:Hex 2:1.

Peale vaheühendi kadumist kontsentreeriti reaktsioonisegu rotaatoraurusti abil ja lahustati EA-s (~40 ml). Orgaanilise faasi pesti küllast. NaHCO_3 lahusega (1 x 30 ml), küllast. NaCl lahusega (1 x 30 ml) ning kuivatati vv Na_2SO_4 -ga. Seejärel EA eemaldati rotaatoraurusti abil ning boor-kompleksi lagundamiseks lahustati saadud õline aine etanoolis (40 ml), milles kuumutati keemistemperatuuri juures 1 h. Boor-kompleksi lagunemist kontrolliti TLC abil kasutades voolutina EA:Hex 2:1. Etanool eemaldati rotaatoraurusti abil ning puhastati toorprodukt kolonnkromatograafiliselt kasutades eluendina EA:Hex 2:1. Nendes tingimustes puhastamine ei osutunud väga efektiivseks ning saadud produktile tehti täiendav kolonnkromatograafiline puhastamine kasutades eluendina EA:Hex 1:1.

Saagis: 56%, TMR spektrid on vastavalt Lisa 17 ja Lisa 18.

^1H TMR (700 MHz, CDCl_3 +TMS, δ): 11,53 (s, 1H, NH); 8,59 (s, 1H, NH); 7,77 (d, J = 7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,59 (d, J = 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,41 (t, J = 7,7 Hz, 2H, Ar(H)); 7,32 (t, J = 7 Hz, 2H, Ar(H)); 6,94 (s, 1H, NH); 4,45 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 4,24 (s, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 3,55 (s, 2H, CH_2); 2,99 (s, 2H, CH_2); 1,76 (s, 2H, CH_2); 1,52 (s, 9H: 3 x $\text{CH}_3(\text{Boc})$); 1,51 (s, 9H: 3 x $\text{CH}_3(\text{Boc})$).

^{13}C TMR (700 MHz, CDCl_3 +TMS, δ): 163,8; 157,3; 156,1; 153,3; 143,7; 141,3; 127,7; 127,1; 125,0; 120,0; 83,2; 79,4; 67; 48,8; 47,2; 38,8; 28,25; 28,09; 26,8.

2.1.3 H-AsaRRASVA-NH₂ ja H-asaRF-NH₂ süntees

Peptiidi sünteesimiseks kasutatavasse 20 ml filterkolonni kaaluti (1,0 ekv; 250 mg; 0,17 mmol) Fmoc-amiid MBHA vaiku (0,68 mmol/g), lisati DCM (10 ml) ja lasti 20 min punduda. Seejärel eemaldati vaigult Fmoc-rühm 20% piperidiini lahusega DMF-is (10 ml) 20 min jooksul ning pesti tahket kandjat järgmiste lahustitega: DMF (5 x 8 ml) ja DCM (1 x 8 ml). Vabade aminorühmade olemasolu kontrollimiseks tehti Kaiseri ja TLC testi [13,20], vajadusel korrati eelnevat etappi või jätkati sünteesi. Fmoc-AH-OH (3,0 ekv; 0,51 mmol) ning karboksüülrühma aktiveerimiseks kasutatavad reagentid TBTU (3,0 ekv; 164 mg; 0,51 mmol) ja HOBt (3,0 ekv; 69 mg; 0,51 mmol) lahustati DMF-is. Arg sidumiseks H-ASVA-NH-vaigule kasutati veel COMU (5,0 ekv; 0,85 mmol) ja PyOxim (5,0 ekv; 0,85 mmol) aktivaatoreid (Lisa 21, **Tabel 6**). Reagentide lahused segati omavahel kokku, lisati DiPEA (6,0 ekv; 0,176 ml; 1,01 mmol) ning saadud lahus lisati kaitsmata vaigule, kus atsüülimisreaktsioonil lasti toimuda ~1 h. Aminohappe seostumist tahke kandjaga kontrolliti ninhüdriini e Kaiseri testiga ning vajadusel korrati atsüülimise etappi [13]. Reagentide ülehulga ja kõrvalproduktide eemaldamiseks tahkelt kandjalt pesti järgmiste lahustitega: DMF (3 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml), DMF (3 x 8 ml). Järgmise aminohappe külge sidumiseks korrati kaitserühma eemaldamise ja atsüülimise etappe.

Peale Fmoc-RASVA-NH-vaik ja Fmoc-asaRF-NH-vaik sünteesi kontrolliti toorpeptiidi aminohappelise järjestuse õigsust HPLC-MS abil (vastavalt Lisa 22 ja Lisa 23). Selleks võeti väike kogus peptiidi ning eemaldati tahke kandja koos püsivate kaitserühmadega, dipeptiidi puhul eemaldati eelnevalt ka Fmoc-kaitserühm. Selleks viidi 2 h jooksul läbi reaktsioon TFA lahusega (95% TFA; 2,5% Milli-Q; 2,5% TIS). Seejärel ekstraheeriti toorpeptiidi jääkülma dietüüleetriga (3 x 1,5 ml), mis aurustati proovist suruõhu abil.

AsaArg prekursori aktiveerimine: kuivatatud 50 ml ümarkolbi kaaluti vajalik kogus asaArg-prekursorit (4,0 ekv; 367 mg; 0,68 mmol) ning varustati kolb N₂-ga täidetud õhupalliga. Kolbi lisati kuiva DCM-i (2 ml) ning DiPEA (8,0 ekv; 0,234 ml; 1,35 mmol). Seejärel, jahutati kolbi jäävannis. Kaaluti BTC (1,32 ekv; 67 mg; 0,224 mmol), lahustati kuivas DCM-is (1 ml) ja viidi ümarkolbi. Saadud lahust segati jäävannil 30 min. Järgnevalt eemaldati Fmoc-RASVA-NH-vaigult ja Fmoc-F-NH-vaigult Fmoc-kaitserühmad eelnevalt kirjeldatud eeskirja järgi. Ümarkolvis valmistatud reagent viidi kolonnis olevale vaigule ja reaktsioonisegu lahjendati kuiva DCM-iga (9 ml). Reaktsioonil lasti toimuda vastavalt 24 h ja 3 h. Asa-aminohappe sidumist kontrolliti TLC ja Kaiseri testiga. Reagentide ülehulga ja kõrvalproduktide eemaldamiseks pesti tahket kandjat järgmiste lahustitega: DMF (3 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml), DMF (3 x 8 ml).

2.1.3.1 H-asaRRASVA-NH₂ tahkelt kandjalt eemaldamine ning puhastamine

Fmoc-asaRRASVA-NH-vaigult eemaldati esmalt Fmoc-kaitserühm lisades vaigule 20% piperidiini/DMF lahust, reaktsioonil lasti käia 20 min ning Kaiseri testi abil kontrolliti vabade -NH₂ rühmade olemasolu. Seejärel valmistati 100 mg asa-peptiid-NH-vaigu kohta 2 ml 95% TFA lahust, kus 2,5% on TIS ja 2,5% Milli-Q (**vt 2.1.3**, Fmoc-RASVA-NH₂ vaigult mahavõtmise) ning reaktsioonil lasti toimuda 4 h. Suurem osa TFA lahust aurustati suruõhu abil ning seejärel ekstraheeriti toorpeptiidi dietüüleetriga (3 x 5 ml), misjärel lahustati see Milli-Q vees, sügavkülmutati ning lüofiliseeriti. Saadud toorpeptiidi järjestust kontrolliti HPLC-MS-iga (Lisa 24, a). Seejärel puhastati H-asaRRASVA-NH₂ kasutades preparatiivset vedelikkromatograafia meetodit. Selleks kaaluti 12-13 mg toorpeptiidi ning lahustati ~1,25 ml voolutis (7% solvendi B sisalduse juures, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is). Süstitud lahuste ruumala oli 300-400 µL. Puhta asa-peptiidi fraktsioonid korjati tsentrifuugituubidesse, mis sügavkülmutati ning lüofiliseeriti. Seejärel ühendati tsentrifuugituubides olev asa-peptiid Milli-Q vee abil, sügavkülmutati, kuivatati uuesti lüofilisaatoris ning määrati puhtus HPLC-MS-ga (220 nm) (**Tabel 1**, Lisa 24, b).

Tabel 1. H-asaRRASVA-NH₂ sünteesi saagised

	Mass, mg	Saagis, %	Puhtus, %
Toorpeptiid	71,25	63,7	40
Puhastatud peptiid	25,9	23,2	95

2.1.3.2 *Asa-arginiini N-terminaalse otsa atsüülimise reaktsiooni kineetilised mõõtmised*

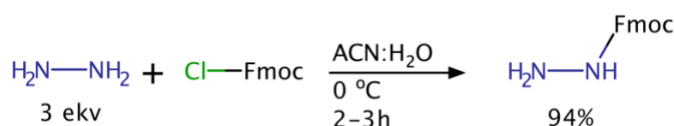
Selle reaktsiooni kineetiliste mõõtmiste teostamiseks kasutati meie teadusgrupis väljatöötatud meetodit.[14] Alustuseks kaaluti punktis **2.1.3** kirjeldatud eeskirja järgi sünteesitud Fmoc-asaRF-NH-vaik (1,0 ekv; 60 mg; 0,0408 mmol) ning eemaldati Fmoc-kaitserühm punktis **2.3.1** kirjeldatud eeskirja järgi. Sellele lisati DMF-i (6 ml) ning termostateeriti 25 °C juures. Järgnevalt kaaluti Fmoc-L-Ala-OH*H₂O (10,0 ekv; 134 mg; 0,408 mmol) ja COMU (10,0 ekv; 175 mg; 0,408 mmol) ning lahustati need vastavalt 3 ml ja 1 ml DMF- s. Reagentide lahused segati omavahel kokku, lisati DiPEA (19,7 ekv; 140 µL; 0,803 mmol) ning eelaktiveeriti 2 min jooksul.[48] Seejärel lisati aktiveeritud Fmoc-L-Ala-OH*H₂O lahus atsüülimisreaktsiooni alustamiseks H-asaRF-NH-vaigule DMF-is. Reaktsiooni kineetika jälgimiseks võeti segust 500 µl proovid kindlate ajavahemike tagant. Saadud proovid viidi filtriga varustatud süstlasse. Reaktsiooni koheseks peatamiseks pesti võetud proovid: DMF-ga (3 x 1 ml), DCM-ga (3 x 1 ml), DMF-ga (3 x 1 ml). Seejärel eemaldati tekkinud Fmoc-AasaRF-NH-vaigult Fmoc-kaitserühm. Püsivate kaitserühmade ning tripeptiidi mahavõtmiseks tahkelt kandjalt lisati sellele tugevalt happelist lahust (95% TFA; 2,5% Milli-Q; 2,5% TIS) ning reaktsioonil lasti toimuda 2 h. Seejärel aurustati õhuvoolus TFA jäägid ning proovi ekstraheeriti dietüüleetriga (3 x 1,5 ml) kasutades tsentrifuugi, mille käigus eemalduvad eetris lahustuvad kõrvalproduktid. Saadud toorpeptiidi analüüsiti HPLC-MS kromatograafia, kust arvutati produkti ja vastava lisandi kui sisestandardi piikide pindalade (S) suhe Y ($Y = \frac{S_{\text{lisand}}}{S_{\text{lisand}} + S_{\text{produkt}}}$). Võrrandi $Y = e^{-k_{\text{obs}}t} + Y_{\infty}$ järgi arvutati reaktsiooni pseudo-esimest järku näiline kiiruskonstant k_{obs} ja reaktsiooni saagis $1 - Y_{\infty}$ kasutades Graphpad 5 tarkvara.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Asa-arginiini prekursori süntees

3.1.1 Asa-arginiini süntees läbi asa-ornitiini

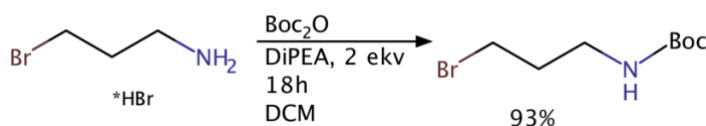
Teadustöö esimeses etapis alustati asa-peptiidide sünteesimiseks vajaliku asaArg prekursori sünteesimist varasemalt välja töötatud meetodil.[12] Selleks sünteesiti esmalt Fmoc-hüdrasiin (*Skeem 12*).



Skeem 12. Fmoc-kaitstud hüdrasiini süntees.

Antud reaktsiooni selektiivsus saavutati tänu hüdrasiini suurele ülehulgale reaktsioonisegus ning Fmoc-Cl tilkhaaval lisamisele madalal temperatuuril. Lisaks sellele, et tagada ühe Fmoc-rühma selektiivne sidumine, on hüdrasiini ülehulk vajalik reaktsiooni jooksul tekkiva vesinikkloriidi sidumiseks. Produkti filtreerimisel pesti seda jääkülma veega, et vabaneda reageerimata jäänud hüdrasiinist ja selle hüdrokloriidist. Seejärel kasutati pesemiseks tolueni, et vabaneda suuremast hulgast veest ja vähepolaarsetest lisanditest. Selle etapi saagised on väga kõrged.

Teiseks vajalikuks lähteaineks antud sünteesirada kasutades on *N*-Boc-3-bromopropüülamiin, kus lämmastik on ühe Boc-rühmaga kaitstud (*Skeem 13*). Süntees viidi läbi segades toatemperatuuril 18 h. Aluselised tingimused on vajalikud 3-bromopropüülamiini soolast vaba aluse saamiseks ning reaktsiooni katalüüsimiseks. Katalüüsiv toime seisneb DiPEA reaktsioonis Boc_2O -ga, mille käigus moodustub tugevalt elektrofiilne vaheühend, mis reageerib nukleofiiliga.



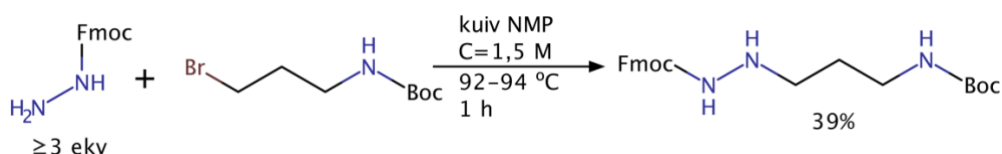
Skeem 13. N-Boc-3-bromopropüülamiini süntees

Järgmiseks etapiks oli vaja sünteesida Fmoc-kaitstud asa-ornitiini prekursor (*Skeem 14*). Reaktsioon viidi läbi algselt Dr. A. Mastitski poolt väljatöötatud ja optimeeritud eeskirja järgi,[12] kuid reaktsioon ei kulgenud ootuspäraselt. Süntees viidi läbi eeskirja järgi ehk destilleerimata NMP-s 92 – 94 °C juures. Peale esimest ebaõnnestunud sünteesi arvati, et kasutatud aparaat (pliit) ei võimaldanud läbi viia reaktsiooni vajaliku temperatuuri juures või

reaktsiooni eksotermilisuse tõttu võis suurte koguste kasutamisega kaasneda reaktsioonisegu ülekuumenemine. Selle reaktsiooni juures on temperatuuri hoidmine antud vahemikus väga oluline, kuna alla 92 °C reaktsioon ei toimu ning 94 °C-st üle hakkab hüdrasiini Fmoc-kaitserühm lagunema, mis soodustab reaktiivide lagunemist ja kõrvalproduktide teket. Pärast kütteseadmest tingitud probleemide välistamist hakati varieerima Fmoc-hüdrasiini kontsentratsiooni (0,5 - 1,6 M) lahuses, kuid kuue läbiviidud sünteesi jooksul ei õnnestunud produkti saada, sest lähteaine lagunes antud reaktsioonitingimustes.

Kuna lähteaine lagunemise põhjus esialgu ei selgunud, hakati paralleelselt arendama alternatiivset sünteesirada (vt 3.1.2).

Edasiste uuringute jooksul aga selgus, et asa-ornitiini prekursori sünteesil kasutatav NMP peab olema värskelt destilleeritud e seismisel tekkivad lisandid ja suurenenud niiskusesisaldus tõenäoliselt soodustavad produkti ja lähteaine lagunemist. Destilleeritud ja kuiva NMP kasutades sai reaktsioon (**Skeem 14**) lõpuni läbiviidud ning produkt saadi kätte reprodutseeruva saagisega.



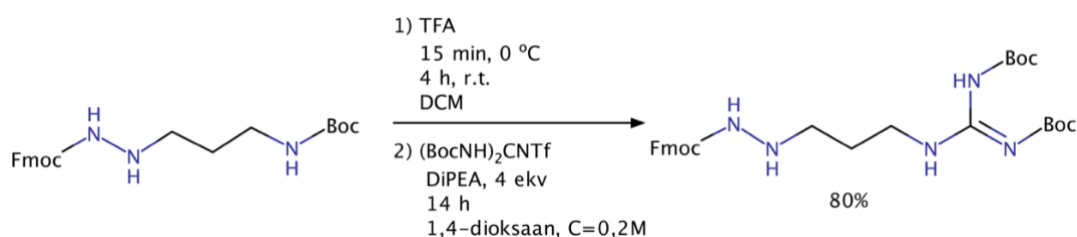
Skeem 14. *N*-Fmoc-*N'*-(3-*N''*-Boc-propüül)hüdrasiini süntees

Värskelt destilleeritud kuivas NMP-s teostati kolm sünteesi, mis on kokku võetud Tabelis 2.

Tabel 2. Asa-ornitiini sünteesi tulemused, kasutades värskelt destilleeritud NMP-d

#	Temperatuur, °C	Fmoc-hüdrasiini ekv, mass (g)	Solvent, M	Saagis, %
1	92-94	3 ekv, 1,16	Kuiv NMP; 1,5	33
2	92-94	3 ekv; 1,50	Kuiv NMP; 1,5	45
3	92-94	3 ekv; 1,39	Kuiv NMP; 1,5	39

Viimases etapis sünteesiti asa-ornitiini prekursorist asa-arginiini prekursor, mis on kaheetapiline reaktsioon (**Skeem 15**).



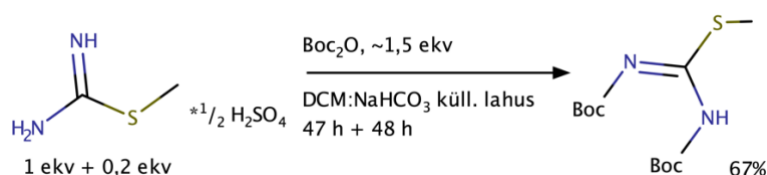
Skeem 15. Asa-ornitiinist asa-arginiini prekursori süntees

Esialgu võetakse Boc-kaitserühm lämmastikult maha kasutades TFA-d. See on üsna aeglane reaktsioon ning vajab TFA suurt ülehulka. TFA lisamine toimus madalal temperatuuril, et vältida kõrvalproduktide teket ning reaktsioonisegu soojenemist. Saadud toorprodukt, Fmoc-propüülaminohüdrasiini TFA sool, ning *N,N'*-di-Boc-*N''*-trifüülguanidiin lahustati 1,4-dioksaanis, mis on polaarne aprotoonne solvent, mille tõttu see ei solvateeri nõrka nukleofiilili ning võimaldab lahustada soola kujul oleva lähteaine. Seejärel lisati alusena DiPEA-d nii Fmoc-propüülaminohüdrasiini soolast väljatõrjumiseks kui ka aluselise reaktsioonikeskkonna tekitamiseks.

3.1.2 Asa-arginiini prekursori alternatiivse sünteesiraja väljatöötamine

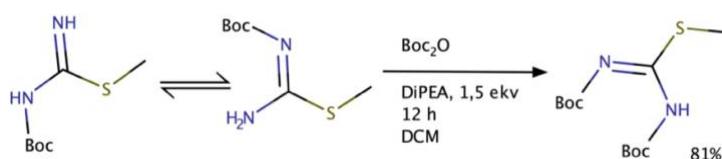
Kuna asaArg prekursori sünteesi läbi asa-ornitiini prekursori ei õnnestunud esialgu läbi viia (vt 3.1.1), hakati asaArg paralleelselt sünteesima võttes aluseks Freeman *et al.* poolt välja töötatud meetodi.[36] Sünteesiraja olulisim etapp on aldehüüdi saamine vastava Weinreb amiidi redutseerimisel. Reaktsiooni saagiseks saadi 33%, mille pärast otsustati antud töös osaliselt muuta Freeman *et al.* sünteesirada, et arendada alternatiivset sünteesiteed, mis annaks kõrgemad saagised, oleks lihtsasti teostatav, reprodutseeritav ning ei vajaks kalleid reagente ega katalüsaatoreid.

Sünteesi alustati *S*-metüülisotiourea hemisulfaadi lämmastike kaitsmisega Boc-kaitserühmadega ja saadi *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea (**Skeem 16**),[46] mis on tulevase asaArg prekursori külgrühma osa.



Skeem 16. Di-Boc-*S*-metüülisotiourea süntees

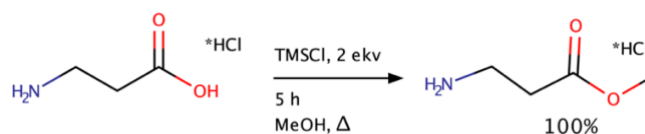
See reaktsioon kulgeb aeglaselt ning vajab intensiivset segamist, kuna reaktsiooni keskkond on heterogeenne. Tekkinud produkt lahustub orgaanilises faasis koos di-*tert*-butüüldikarbonaadiga, mistõttu reaktsiooni lõpuni viimiseks lisatakse juurde täiendav kogus *S*-metüülsotiourea hemisulfaati reaktsioonisegusse juurde. Reaktsiooni käigus tekib ka kõrvalprodukt, milleks on Boc-monokaitstud *S*-metüülisotiourea (**Skeem 17**).



Skeem 17. Di-Boc-*S*-metüülisotiourea süntees mono-Boc-*S*-metüülisotiouureast

See on kolonnkromatograafiliselt produktist eraldatav ning kasutades Boc₂O lahust DCM-is DiPEA juuresolekul, on võimalik sellest vajalik produkt saada (eeskiri Lisa 20).

Järgnevalt sünteesiti β-alaniini hüdrokloriidi soolast vastav metüülester (**Skeem 18**).



Skeem 18. β-alaniini metüülestri hüdrokloriid

Selle reaktsiooni saagised on kvantitatiivsed. TMSCl reageerib metanooliga andes trimetüülsilüülmetüüleetri ja vabaneb HCl, mis katalüüsib estri moodustumisreaktsiooni ning aitab hoida reaktsioonikeskkonda veevabana.

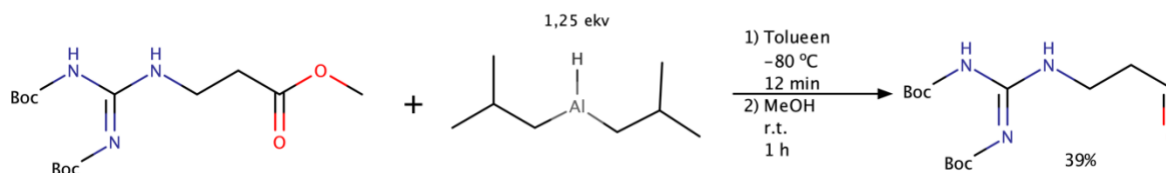
Saadud β-alaniini metüülestri hüdrokloriidist ja *N,N'*-di-Boc-*S*-metüüluureast valmistati metüül-3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaat (**Skeem 19**). Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati aluselist keskkonda, et β-alaniin viia metüülestri hüdrokloriidist vabaks aluseks.



Skeem 19. Metüül-3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadi süntees

Reaktsiooni käigus atakeerib β-alaniini metüülestri *N*-terminaalne ots guanidileerivat reagenti ning seejärel vabastatakse metüültio-rühm.

Järgnevalt prooviti sünteesida 3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaali eelnevalt saadud metüül-3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaadist kasutades diisobutüülalumiiniumhüdriidi (**Skeem 20**), mis on tuntud meetod aldehüdide sünteesiks.[49]



Skeem 20. 3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaali süntees

Kirjanduses ei ole mainitud selle reaktsiooni kasutamist nii steeriliselt raskendatud ühendi nagu asaArg prekursori sünteesi jaoks vajaliku aldehüüdi valmistamiseks. Estri redutseerimist DIBAL-H-ga aldehüdiks viiakse läbi madalal temperatuuril, mille juures alumiiniumatsetaal on stabiilne ja lisaks tagab selektiivsuse suurenemise reaktsiooni kiiruse vähenemise arvelt. Reaktsiooni lõpetamiseks lisatakse metanooli, mis neutraliseerib üleliigse DIBAL-H ja

lagundab vaheühendeid. DIBAL-H on tugev elektrofiilne redutseerija, redutseerides estri juba toatemperatuuril esmalt aldehyüdiks ja seejärel alkoholiks. Vajalikuks reaktsiooniks on aldehyüdi saamine, mistõttu on solventi valik oluline, kuna on leitud, et doonorsete solventide nagu THF-i ja eetri kasutamine soodustab üleredutseerimist ja vähendab diastereoselektiivsust. [50] Donoorne solvent moodustab tetraedrilise vaheühendiga Lewisi happe-alus kompleksi, mis nõrgendab estri karbonüülset sidet hapnikuga. Seetõttu on kompleksi lagunemine kiirem kui moodustumine ja vabanenud aldehyüd redutseeritakse kohe alkoholiks. Antud töö käigus läbiviidud reaktsioon THF-is ei toimunud. Praegu kõige efektiivsemaks solventiks vastava estri redutseerimiseks osutus toluen, milles aldehyüdi elimineerimine toimub aeglasemalt kui hüdriidi sidumine estri külge. Edasi on plaanis proovida teisi mittepolaarseid solvente nagu hekseen. Tabelis 3 on välja toodud reaktsioonide tingimused.

Tabel 3. 3-(N^{ω}, N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propaanaadiga läbiviidud sünteeside tingimused ja tulemused

#	Lähteaine mass, g	Solvent	DIBAL-H, ekv	Kõrvalproduktide teke	Saagis, %
1	0,107	Tolueen	0,33	–	35
2	*0,148	Tolueen	0,56	–	<5
3	0,106	THF	1,50	–	–
4	0,148	Kuiv toluen	0,50	–	<5
5	0,152	Kuiv toluen	0,75	–	<5
6	0,150	Kuiv toluen	1,00	–	<5
7	0,150	Kuiv toluen	1,25	–	<5
8	0,150	Tolueen	0,75	–	22
9	0,148	Tolueen	1,00	–	37
10	0,149	Tolueen	1,25	–	48
11	1,060	Tolueen	1,50	+	40
12	0,883	Tolueen	1,25	–	40

*kolb jäi läbi kuumutamata

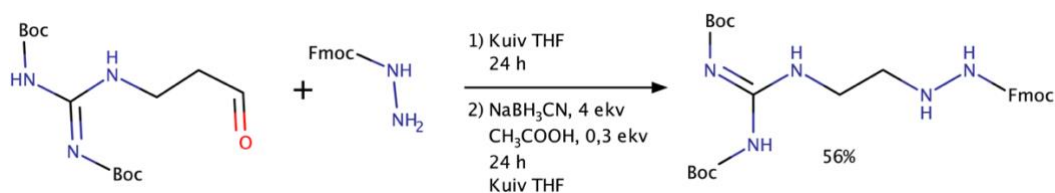
Tabelist 3 on näha, et antud uurimustöös varieeriti DIBAL-H hulka ja uuriti erinevate solventide ja nende veesisalduse mõju redutseerimise reaktsioonile. Kõikides katsetes, v.a nr 2, kuumutati kolb läbi ning jahutati N₂ voolus. Esimese läbiviidud eksperimendi saagiseks saadi 35,2%. DIBAL-H on väga tundlik vee suhtes, seega arvati, et toluenis sisalduv vesi võib

reaktsioonist osa võtva DIBAL-H kogust vähendada. Seetõttu prooviti solvendina THF, et reaktsiooni kiirendada, kuid reaktsioon ei toimunud.

Teiseks prooviti reaktsiooni läbi viia värskelt destilleeritud toluenis (Lisa 19, b). Selle tulemusena oli TLC plaadilt näha, et kõrvalprodukte ei tekkinud. Proovis oli peamiselt näha lähteainet ja produkti jälgi, millest tehti järeldus, et reaktsioon praktiliselt ei toimunud. Samuti oli väga üllatav, et kuivatamata jäänud kolvis produkti peaaegu ei tekkinud, samas ka kuivas suletud süsteemis ei kulgenud reaktsioon DIBAL-H ülehulgas. Sellest võib järeldada, et toluenis sisalduv veehulk on vajalik reaktsiooni katalüüsiks.

Antud reaktsiooni tingimusi oleks võimalik veel optimeerida varieerides reaktsiooniaegu, solvente ja reagentide suhteid, kuid töö esialgseks eesmärgiks oli sünteesida *asaArg* prekursor ja 11 proovisünteesi tulemusena saadud vaheühendi 48% saagist loeti rahuldavaks, et sünteesi jätkata.

Selleks pandi puhastatud aldehüüd reageerima eelnevalt valmistatud Fmoc-hüdrasiiniga Freeman *et al.* artiklis kirjeldatud eeskirja järgi (**Skeem 21**).[36]



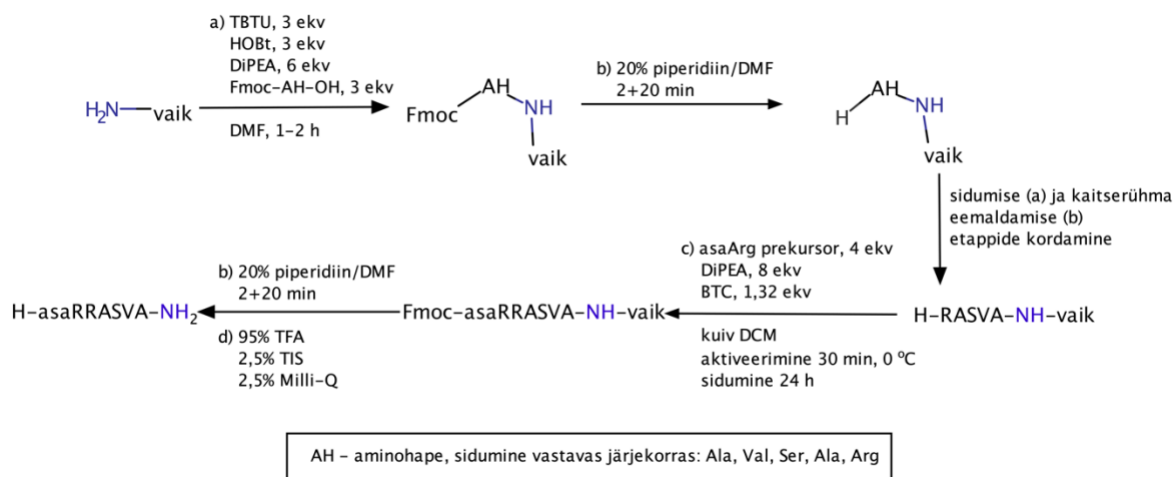
Skeem 21. *AsaArg* prekursori süntees 3-(*N*^ω,*N'*^ω-di-Boc-guanidüül)propanaalist

Reaktsiooni katalüüsiks ei kasutata happeid, kuna need võivad eemaldada lähteaine Boc-kaitserühmad. Sellepärast on reaktsiooni läbiviimine ajaliselt mahukas. Redutseerimisel saadav lõpp-produkt moodustab booriga donoorse-aktseptoorse kompleksi, mille lagunemiseks on vaja toorprodukt esmalt ekstraheerida ja seejärel keeta etanoolis ~1 h. Kompleksi lagunemisel tekib trietüülboraat vabastades *asaArg* prekursori.

Reaktsiooni läbiviimisel probleeme ei esinenud, kirjanduses toodud sünteesi etapp oli reprodutseeritav. Toorprodukti puhastati *flash*-kromatograafi asemel kolonnkromatograafiliselt, mistõttu oli vaja leida sobiv vooluti.

3.1.3 H-*asaRRASVA*-NH₂ süntees

Sünteesitud *asaArg* prekursorit kasutati järgnevalt PKA substraadi *asa*-analoogi *asaRRASVA* sünteesimiseks (**Skeem 22**). Aminohappelise järjestuse H-RASVA-NH-vaik sünteesimiseks kasutati standardset SPPS protokollit.



Skeem 22. *H-AsaRRASVA-NH₂ süntees*

Kui H-ASVA-NH-vaik järjestuse saamiseks tuli vastavaid aminohappeid lisada vaigule ainult ühe korra (Lisa 21), siis Arg lisamisel *N*-kaitsmata H-ASVA-NH-vaigule tuli sidumisetappe korrata (**Tabel 4**). See on tingitud ilmselt Arg suuremast mahukusest võrreldes eelneva peptiidijärjestuses oleva aminohappega, takistades ligipääsu vähem aktiivsetele aminorühmadele.

Tabel 4. Arginiini sidumine H-ASVA-NH-vaigule

#	Aktivaator	ekv	t, h	KT	TLC	HPLC-MS
1	TBTU/HOBt	3	1	Sinine	-	-
2	TBTU/HOBt	5	2	Sinine	-	-
3	PyOxim[48]	5	2	Tumeroosa	-	-
4	COMU[51]	5	2	Roosa	+	±

Selleks suurendati algselt lähteainete koguseid ja pikendati reaktsiooniaega. Kaiseri testi negatiivse tulemuse tõttu vahetati järgnevalt aminohappe aktivaator PyOxim vastu. KT värvus oli muutunud sinisest roosakamaks, mis näitas, et reaktsioon oli edasi toimunud. KT test on küll üsna tundlik reageerimata jäänud vabade aminorühmade suhtes, kuid et veenduda reaktsiooni lõpuni kulgemises, korrati veelkord sidumise etappi aktivaatoriga COMU, mis on üks uuemaid ja efektiivsemaid SPPS aktivaatoreid.[43] KT oli endiselt roosaka varjundiga, seega otsustati kontrollida aminohappelist järjestust Fmoc-RASVA-NH₂ HPLC-MS analüüsil (Lisa 22) ning kromatogrammilt ei leitud H-ASVA-NH₂ jälgi. Edaspidi oleks mõistlikum Arg ja teisi mahukaid aminohappeid sisaldavate peptiidide sünteesimisel kasutada väiksema kui 0,68 mmol/g laadimisastmega vaiku või blokeerida atsüülimise teel esimese aminohappe

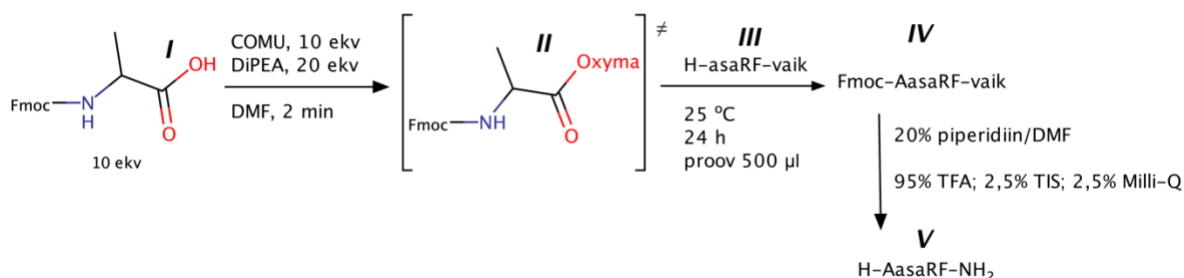
sidumisel vähemaktiivsed aminorühmad, mille külge mahukate aminohapete sidumine on raskendatud.

Viimasena seoti peptiidijärjestusse *asaArg* prekursor kasutades selle aktiveerimiseks üldjuhul varasemalt välja töötatud meetodit,[3,14] kus prekursor konverteeritakse vastavaks *asa*-aminohappe klooranhüdriidiks aktivaatori BTC abil (**Skeem 8** ja **Skeem 22, c**). Antud sünteesis aga pikendati *asa*-aminohappe sidumise reaktsiooni aega kolmelt tunnilt 24-le tunnile, kuna kineetiliste mõõtmiste esialgsed tulemused meie uurimisgrupis näitavad, et reaktsioon ei ole veel kolme tunni jooksul lõppenud. Enne toorpeptiidi tahkelt kandjalt lõikamist veenduti veel HPLC-MS analüüsil *asaArg* liitumises peptiidile ning peale lõikamist määrati HPLC-MS analüüsil sünteesitud toorpeptiidi puhtus (Lisa 24, a). Seejärel puhastati toorpeptiid kasutades preparatiivset HPLC meetodit ning tulemuseks saadi mõistliku saagisega puhas (Lisa 24, b) peptiid.

Peptiidi puhastamiseks kasutatav meetod on küllaltki rahuldav, kuid *asa*-aminohappe prekursori BTC-ga aktiveerimisel tekib palju lisandeid (*H-asaRRASVA-NH₂* sisaldus toorproduktis oli 40%, **Tabel 1**), mille tõttu oleks vaja välja töötada sobivam aktivaator või aktiveerimismeetod.

3.1.4 *Asa*-peptiidsideme moodustumine mudelpeptiidis *H-AasaRF-NH₂*

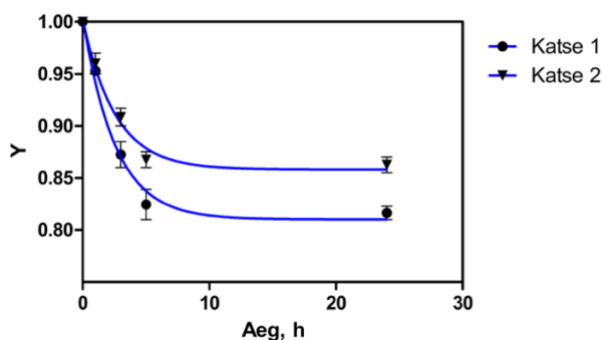
Kui *asa*-aminohappe sidumine eelnevale aminohappele läheb üldjuhul peaaegu lõpuni, siis *asa*-peptiidi sünteesis on kõige kriitilisem etapp *asa*-aminohappejäägi *N*-terminaalsele otsale järgmise aminohappe sidumine (**vt 1.2.2**). Antud töö valmimise käigus on meie teadusgrupis viidud läbi kineetilisi mõõtmisi aktivaatoriga COMU mudelpeptiidis *H-AasaAH-F-NH₂*, kus varieeriti *asa*-aminohapete külgrühma struktuuri. Esiteks leiti, et steerilise takistus suurenemine vastavas *asa*-aminohappejäägis aeglustab oluliselt *asa*-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni. Teiseks ei kulge reaktsioon mõnede testitud *asa*-aminohapetega lõpuni ning Ala ei õnnestunud antud meetodil üldse siduda *asaVal* külge, mis on testitud *asa*-aminohapetest kõige mahukam (avaldamata andmed). Seetõttu otsustati enne substraadi *H-RasaRASVA-NH₂* sünteesi kontrollida, kas on võimalik antud meetodit kasutada Ala sidumiseks *asaArg* külge, mida pole veel siiani testitud. Selleks sünteesiti esmalt *asa*-dipeptiid *H-asaRF-NH₂*-vaik (**Skeem 23, III**) punktis 2.1.3 kirjeldatud eeskirja järgi. Etappide efektiivsust jälgiti Kaiseri ja TLC testidega, mis andsid soovitud tulemused, ning tekkinud dipeptiidi järjestust kontrolliti lõpuks ka HPLC-MS-ga.



Skeem 23. Asa-arginiini *N*-terminaalsele otsale alaniini sidumise kineetiline uurimus

Tahkelt kandjalt eemaldatud ning ilma Fmoc-kaitserühmata asa-dipeptiidi H-asaRF-NH₂ HPLC-MS analüüsil saadud massispekter näitas aga oodatud tulemuse asemel lisandi massi, mis oli 16 g/mol võrra väiksem vastavast dipeptiidi massist, mis viitab nagu oleks üks –NH₂ rühm ühendist eemaldunud (Lisa 25, c). Seetõttu otsustati kontrollida asa-dipeptiidi struktuuri jättes enne tahkelt kandjalt eemaldamist asaArg *N*-terminaalsele otsale Fmoc-kaitserühma külge (Fmoc-asaRF-NH₂). Selle tulemusena leiti, et ühend, mis vastab Fmoc-asaRF-NH₂-massile on massispektris siiski olemas (Lisa 23). Sellest järeldati, et H-asaRF-NH₂ võib laguneda või tsykliseeruda tugevalt happelises keskkonnas tahkelt kandjalt mahavõtmise reaktsiooni jooksul. Sellist asa-aminohappe lagunemist TFA-ga töötlemise käigus asa-peptiidi *N*-terminaalses otsas on varasemalt täheldatud ka asaGly korral.[52]

Seejärel viidi pseudo-monomolekulaarsetes tingimustes läbi kineetilised mõõtmised COMU-ga aktiveeritud Ala-ga **II**, võttes Ala 10-kordses ülehulgas, et siduda Ala **I** sünteesitud asa-dipeptiidi **III** külge (**Skeem 23**) ning uurida, kas Ala seob end asaArg *N*-terminaalsele otsale. Protsessi jälgimiseks võeti kindlate ajavahemike tagant reaktsioonisegust proove, eemaldati tekkinud tripeptiidilt **IV** Fmoc-kaitserühm ning analüüsiti HPLC-MS-ga (Lisa 25, b ja e). Reaktsioonisegus esines peale produkti **V** kaks suurt lisandit, millest esimene on arvatavasti vastav lähteaine lagunenuks kujul ning teise struktuur ei ole teada, kuid visuaalsel hindamisel tundus, et lisandite kogus proovis aja jooksul ei muutu. Eelnevates mudel asa-peptiidide kineetilistes uuringutes on vastava reaktsiooni kiirus ja saagis arvatatud lähteaine kadumise järgi ajas kasutades HPLC analüüsil saadud kromatogrammilt arvatatud lähteaine ja produkti piikide pindalasid.[13–15] Antud reaktsioonis aga lähteaine **III** tõenäoliselt proovi töötlemise käigus laguneb, mistõttu otsustati produkti koguse suurenemise esialgseks hindamiseks arvutada reaktsioonisaagis nii ühe kui teise lisandi piigi pindala suhtes (**vt 2.1.3.2**). Tabelist 5 ja Jooniselt 1 on näha, et ühe reaktsiooniseeria piires mõlema lisandi suhtes arvutatud näilised kiiruskonstandid k_{obs} ja reaktsioonisaagis $(1-Y_{\infty})$ langevad kokku.



Joonis 1. Ühendis H-AasaRF-NH₂ asa-peptiidside moodustumise reaktsiooni kineetilised kõverad kasutades aktivaatorit COMU temperatuuril 25 °C

Tabel 5. COMU-ga aktiveeritud Fmoc-L-Ala-OH*H₂O lähtepeptiidile H-asaRF-NH-vaik sidumise kineetiliste mõõtmiste tulemused DMF-s temperatuuril 25 °C

#	$k_{\text{obs}}, \text{min}^{-1}$	$1-Y_{\infty}$	R^2
1	$0,006553 \pm 0,001$	$0,1958 \pm 0,013$	0,97
2	$0,006511 \pm 0,001$	$0,1448 \pm 0,010$	0,97

* Mõlemas katses saadud kiiruskonstante arvutati nii lisandi 1, kui ka lisandi 2 järgi

Antud tingimustel viidi läbi 2 paralleelmõõtmist ning Tabelist 5 on näha, et reaktsioon toimub ainult 14,5 – 19,6% ulatuses. Varasemalt on teada, et samades tingimustes läbiviidud reaktsioon asaAla-ga kulgeb praktiliselt lõpuni (99%) kiirusega $k_{\text{obs}}=0,022 \pm 0,001\text{min}^{-1}$. [14] Sellest järeldati, et tõenäoliselt on antud reaktsioon asaArg-ga selle mahuka külgrühma tõttu liiga aeglane ning COMU-ga aktiveeritud Ala võib reaktsiooni vältel ära laguneda, mida näitavad ka vastavad uuringud COMU kasutamise piirangute kohta SPPS-s. [53] Seega otsustati järgnevalt testida, kas antud reaktsioon kulgeb edasi, kui reagentide reaktsiooni käigus juurde lisada. Sama kogus reagentide lisati reaktsioonisegusse peale 3 tunni möödumist pärast reaktsiooni algust ning lasti toimuda 48 h võttes reaktsiooni segust proove. HPLC-MS tulemuste analüüsil selgus, et reaktsioon ei olnud märkimisväärselt edasi läinud ($1-Y_{\infty}$ 32,7%). Enne lõplikke järeldusi tuleks aga esmalt välja töötada meetod selle reaktsiooni täpsemaks kvantitatiivseks iseloomustamiseks. Üheks võimaluseks on kineetiliste mõõtmiste käigus võetud proovis sisalduva lähtepeptiidi **III (Skeem 23)** N-terminaalne ots enne tahkelt kandjalt lõikamist uuesti Fmoc-rühmaga ära kaitsta, et vältida ühendi lagunemist happelistes reaktsioonitingimustes. Seega otsustati kineetiliste mõõtmiste käigus tekkinud probleemide valguses mudelpeptiidis H-AasaRF-NH₂ antud töö raames piirduda ühendi asaRRASVA sünteesimisega. Sobiva saagisega peptiidi asa-analoogi RasaRASVA sünteesimiseks tuleb asaArg-le järgneva aminohappe sünteesimeetodit veel edasi arendada.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli sünteesida PKA substraadi RRASVA asa-analoogid asaRRASVA ja RasaRASVA, kasutades asaArg prekursori sünteesimiseks meie uurimisgrupis Dr. A. Mastitski väljatöötatud ja optimeeritud sünteesimeetodit. Mitmete ebaõnnestunud asaArg prekursori sünteeside teostamisel antud meetodi järgi selgus, et asa-ornitiini sünteesiks vastavatest lähteainetest peab solvent (NMP) olema kuiv ja värskelt destilleeritud. Sünteesi ebaõnnestumise põhjuste lahendamise käigus hakati prekursori sünteesimiseks paralleelselt arendama ka alternatiivset sünteesirada. Selleks täiendati Freeman *et al.* meetodit pakkudes sünteesiraja keskse ühendi e aldehyüdi uut saamise viisi, mida varasemalt ei ole asa-aminohapete prekursorite süntesis mainitud. Aldehyüdi uus saamise meetod lähtus metüül-3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidüül)propanaadist ning redutseeriti viimast DIBAL-H-ga vastavaks aldehyüdiks varieerides proovisünteeside jooksul DIBAL-H koguseid. Parima tulemuse andnud lähteainete suhete järgi viidi läbi ka preparatiivne süntees. Viimases etapis sünteesiti saadud aldehyüdist asaArg prekursor Freeman *et al.* artiklis kirjeldatud meetodi järgi.

Saadud asaArg prekursorit kasutati RRASVA asa-analoogi asaRRASVA sünteesimiseks kasutades aminohapete sidumiseks SPPS meetodit. Sünteesi kõige keerulisemaks etapiks oli Arg sidumine H-ASVA-NH-vaigule, mida tuli korrata. AsaArg sidumisel peptiidi külge andis hea saagise ning toorpeptiidi puhastamiseks kasutati preparatiivset HPLC meetodit.

Esialgsed tulemused, mis saadi hiljuti meie töögrupis läbiviidud reaktsiooni kineetiliste uuringute põhjal näitavad, et steerilise takistuse suurenemine asa-aminohappejäägis, millele seotakse aktivaatoriga COMU aktiveeritud aminohapet, aeglustab oluliselt asa-peptiidsideme moodustumise reaktsiooni. Lisaks ei kulge reaktsioon mõnede testitud asa-aminohapetega lõpuni või ei toimu üldse. Seetõttu otsustati enne RasaRASVA asa-analoogi sünteesi läbiviimist uurida kineetilisel meetodil mudelpeptiidis H-AasaRF-NH₂ asa-peptiidsideme moodustumise efektiivsust. Selgus, et seni kasutusel olnud kvantitatiivne meetod selle reaktsiooni efektiivsuse hindamiseks ei sobi, kuna proovi töötlemise käigus lähteaine laguneb. Seega otsustati piirduda ühe PKA miinimumsubstraadi asa-analoogi sünteesiga, kuni efektiivsem meetod asa-peptiidsideme moodustamiseks on leitud.

SUMMARY

The aim of this study was to synthesize PKA minimum substrate RRASVA aza-analogues azRRASVA and RazRASVA using azArg precursor synthesis method that was developed and optimised in our research group by Dr. A. Mastitski. After few unsuccessful attempts to synthesize azArg precursor, it turned out that aza-ornithine synthesis in corresponding conditions must be performed in dry and freshly distilled solvent (NMP). While analysing the reasons of failed synthesis, in parallel a development of an alternative synthetic path was started. For this, the method used by Freeman *et al.* was modified by offering a new path for aldehyde preparation performed in a way that has not been used in aza-amino acid precursor synthesis yet. In detail, methyl-3-(N^{ω},N'^{ω} -di-Boc-guanidyl)propanate was reduced by DIBAL-H to a corresponding aldehyde. A variety of DIBAL-H amounts according to methyl ester was tested, and a preparative synthesis was performed in best obtained reaction conditions. In the last step, azArg precursor was synthesized *via* Freeman *et al.* described method using corresponding aldehyde.

The synthesized azArg precursor was used to prepare azRRASVA *via* SPPS method for amino acid coupling. The most complicated step was to couple Arg to H-ASVA-NH-resin, as this step had to be repeated several times. AzArg was coupled to the peptide in good yields and purification of the crude peptide was performed with preparative HPLC.

The preliminary results of kinetic study performed by our research group has shown that the increase of steric hindrance in aza-amino acid side group decelerates the aza-peptide bond formation reaction rate substantially. In addition, the reactions with several tested aza-amino acids do not reach to the end or do not proceed at all. Therefore, it was decided to study the effectiveness of aza-peptide bond synthesis on model peptide H-AazRF-NH₂ by kinetic method before the synthesis of aza-analogue RazRASVA. It turned out that the previously used quantitative method is not suitable to evaluate the effectiveness of the corresponding reaction as the starting material, aza-dipeptide, decomposes while processing the reaction mixture. Thus, it was decided to restrict with a synthesis of one minimum substrate analogue until the more effective methods for aza-peptide bond formation are developed.

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. G, L. C.; Gupton, B. F.; Carroll, D. L.; Tuhy, P. M.; Kam, C.; Powers, C. Reaction of Azapeptides with Chymotrypsin-like Enzymes. **1984**, No. 1967.
3. Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-Amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7 (6), 864–878.
4. 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.
5. Avan, I.; Dennis Hall, C.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (10), 3575–3594.
6. Estiarte, M. A.; Rich, D. H. Peptidomimetics for Drug Design. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; Donald, J. A., Ed.; Wiley & Sons, Inc: Madison, Wisconsin, 2003; Vol. 1, pp 633–685.
7. Begum, A.; Sujatha, D.; Prasad, K. V. S. R. G.; Bharathi, K. A Review on Azapeptides: The Promising Peptidomimetics. *Asian J. Chem.* **2017**, 29 (9), 1879–1887.
8. Hess, H. J.; Moreland, W. T.; Laubach, G. D. N-[2-Isopropyl-3-(L-Aspartyl-L-Arginyl)-Carbazoyl]-L-Tyrosyl-L-Valyl-L-Histidyl-L-Prolyl-L-Phenylalanine, an Isostere of Bovine Angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (24), 4040–4041.
9. Mastitski, A. Preparation of α -Aza-Amino Acid Precursors and Related Compounds by Novel Methods of Reductive One-Pot Alkylation and Direct Alkylation, University of Tartu, 2018.
10. Eller, M.; Sepp, A.; Toomik, R.; Ekman, P.; Järv, J.; Ragnarsson, U.; Engström, L. Studies on the Substrate Specificity of CAMP-Dependent Protein Kinase Using Diastereomeric Peptides. *Biochem. Int.* **1991**, 25 (3), 453–460.
11. Kisseljova, K.; Kuznetsov, A.; Baudy-Floc'h, M.; Järv, J. Effect of Two Simultaneous Aza- β 3-Amino Acid Substitutions on Recognition of Peptide Substrates by CAMP Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39 (4), 133–137.
12. Mastitski, A.; Kisseljova, K.; Järv, J. Synthesis of the Fmoc-Aza-Arg(Boc)₂ Precursor

- via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2014**, 63 (4), 438.
13. Troska, A. Peptiid- Ja Asa-Peptiidsideme Tekke Kineetiline Uurimus, University of Tartu, 2017.
 14. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**.
 15. 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.
 16. Cherkupally, P.; Acosta, G. A.; Ramesh, S.; De La Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS), C-Terminal vs. Side-Chain Anchoring: A Reality or a Myth. *Amino Acids* **2014**, 46 (8), 1827–1838.
 17. Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. Current Protocols in Protein Science. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2002**, 26, 1–17.
 18. Perez Espitia, P. J.; de Fátima Ferreira Soares, N.; dos Reis Coimbra, J. S.; de Andrade, N. J.; Souza Cruz, R.; Alves Medeiros, E. A. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, 11 (2), 187–204.
 19. Jakubke, H.-D.; Jeschkeit, H. Аминокислоты, Пептиды, Белки.; «Мир»: Москва, 1985; pp 89–97.
 20. Howl, J. *Peptide Synthesis and Applications*; 2005; Vol. 298.
 21. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149.
 22. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino-Acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 3 (13), 537.
 23. Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, 16 (2), 97–116.
 24. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852.
 25. Abo-Dya, N. E.; Biswas, S.; Basak, A.; Avan, I.; Alamry, K. A.; Katritzky, A. R. Benzotriazole-Mediated Synthesis of Aza-Peptides: En Route to an Aza-Leu-enkephalin Analogue. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (8), 3541–3552.
 26. Traoré, M.; Gignac, M.; Doan, N.-D.; Hof, F.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Chromobox Homolog 7 (CBX7) Ligands. *J. Pept. Sci.* **2017**, 23 (4), 266–

- 271.
27. Lee, S.-W.; Lim, J.-M.; Bhoo, S.-H.; Paik, Y.-S.; Hahn, T.-R. Colorimetric Determination of Amino Acids Using Genipin from *Gardenia Jasminoides*. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480* (2), 267–274.
 28. Zhang, R.; Durkin, J. P.; Windsor, W. T. Azapeptides as Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3 Serine Protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (7), 1005–1008.
 29. Bredihhin, A.; Mäeorg, U. Effective Strategy for the Systematic Synthesis of Hydrazine Derivatives. *Tetrahedron* **2008**, *64* (28), 6788–6793.
 30. Trabocchi, A.; Guarna, A. Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry. *The Art of Transforming Peptides in Drugs*; John Wiley & Sons, 2014; pp 5–31.
 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.; et al. Novel Semicarbazide-Derived Inhibitors of Human Dipeptidyl Peptidase I (HDPPI). *Bioorganic Med. Chem.* **2005**, *13* (14), 4408–4424.
 32. Kost, A. N.; Sagitulin, R. S. Monoalkylhydrazines. *Russ. Chem. Rev.* **1964**, *33* (4), 159–176.
 33. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (12), 2897–2904.
 34. Mastitski, A.; Järv, J. One-Pot Synthesis of Fmoc- and Boc-Protected Aza-Methionine Precursors from 2-Methylthioacetaldehyde Dimethyl Acetal. *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, *46* (6), 559–564.
 35. Mastitski, A.; Haljasorg, T.; Kipper, K.; Järv, J. Synthesis of Aza-Phenylalanine, Aza-Tyrosine, and Aza-Tryptophan Precursors via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2015**, *64* (2), 168.
 36. Freeman, N. S.; Tal-Gan, Y.; Klein, S.; Levitzki, A.; Gilon, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis: Aza Scan of a PKB/Akt Inhibitor Using Aza-Arginine and Aza-Proline Precursors. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (9), 3078–3085.
 37. Busnel, O.; Bi, L.; Dali, H.; Cheguillaume, A.; Chevance, S.; Bondon, A.; Muller, S.; Baudy-Floc'h, M. Solid-Phase Synthesis of “Mixed” Peptidomimetics Using Fmoc-Protected Aza-B³-Amino Acids and α -Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (26), 10701–10708.
 38. 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* (21), 6759–6764.

39. Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (7), 1541–1556.
40. Traoré, M.; Doan, N. D.; Lubell, W. D. Diversity-Oriented Synthesis of Azapeptides with Basic Amino Acid Residues: Aza-Lysine, Aza-Ornithine, and Aza-Arginine. *Org. Lett.* **2014**, *16* (13), 3588–3591.
41. Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 8142–8155.
42. Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T. Synthesis of Azapeptides by the Fmoc/Tert-Butyl/Polyamide Technique. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, No. 22, 2843.
43. Chantell, C. A.; Onaiyekan, M. A.; Menakuru, M. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Comparative Study of Different Activators. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (2), 88–91.
44. Kisseljova, K.; Kuznetsov, A.; Baudy-Floc'H, M.; Järv, J. Aza-B3-Amino Acid Containing Peptidomimetics as CAMP-Dependent Protein Kinase Substrates. *Bioorg. Chem.* **2010**, *38* (5), 229–233.
45. Järv, J.; Ragnarsson, U. Linear Free Energy Relationships in CAMP-Dependent Protein Kinase Reactions with Synthetic Substrates. *Bioorg. Chem.* **1991**, *19*, 77–87.
46. Fowler, L. C.; Herman, H.; Flesher, J. W. Total Synthesis of ($\pm$)-15-Deoxyspergualin. *J. Org. Chem.* **1987**, *54* (8), 3478–3479.
47. Liu, C.; Guo, W.; Shi, X.; Kaium, M. A.; Gu, X.; Zhu, Y. Z. Leonurine-Cysteine Analog Conjugates as a New Class of Multifunctional Anti-Myocardial Ischemia Agent. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (9), 3996–4009.
48. Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. PyOxP and PyOxB: The Oxyma-Based Novel Family of Phosphonium Salts. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (16), 3665–3673.
49. Zakharkin, L. I.; Khorlina, I. M. Reduction of Esters of Carboxylic Acids into Aldehydes with Diisobutylaluminium Hydride. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3* (14), 619–620.
50. Boussonnière, A.; Bénétiau, R.; Lebreton, J.; Dénès, F. Aluminum Acetals in Organic Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 35, 7853–7866.
51. Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and

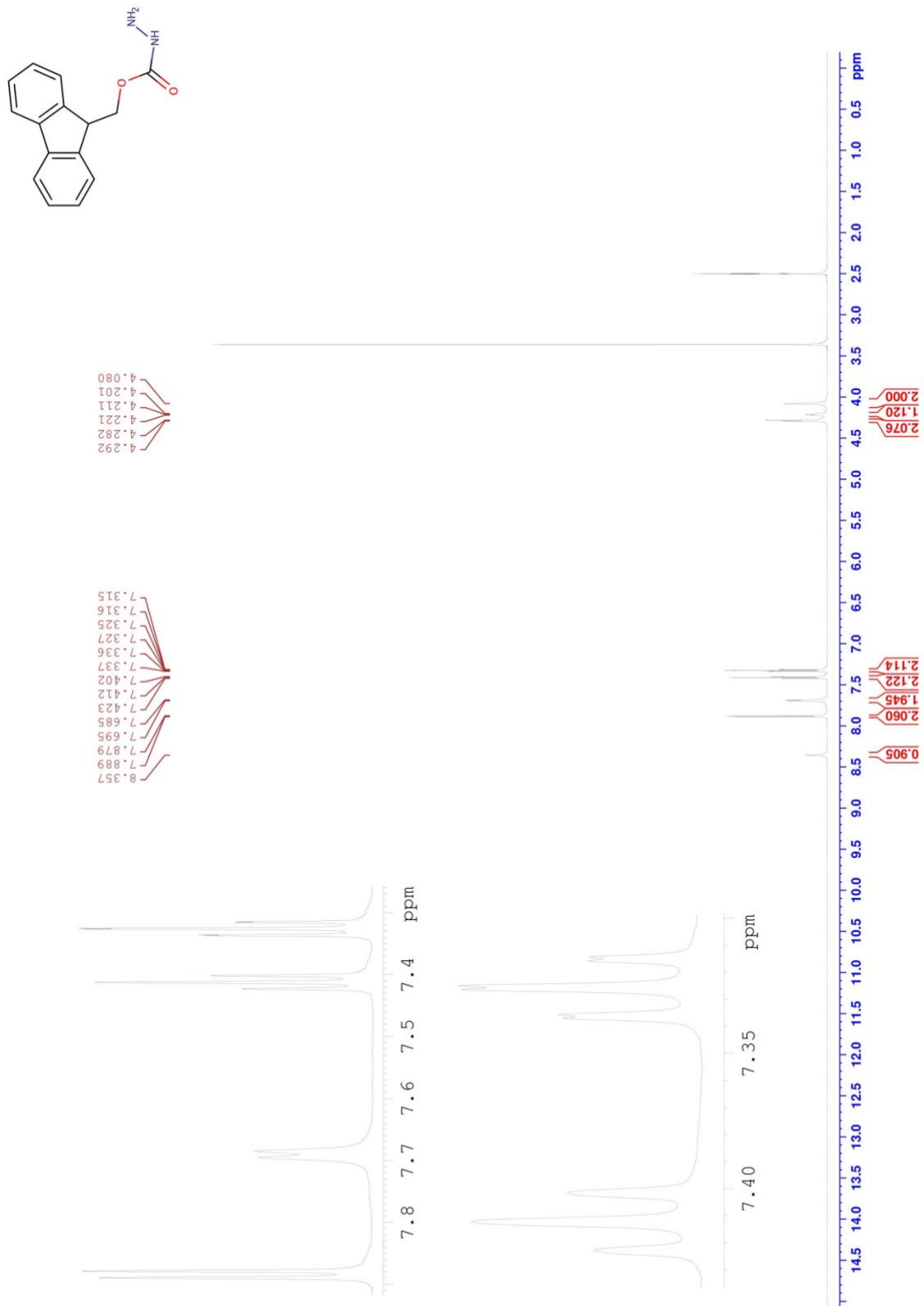
- HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403.
52. McMechen, M. A. Structural Impact of Aza-Amino Acid Substitution in β -Hairpin Model Systems., North Carolina State University, 2018.
53. El-Faham, A.; Albericio, F. COMU: A Third Generation of Uronium-Type Coupling Reagents. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16* (1), 6–9.

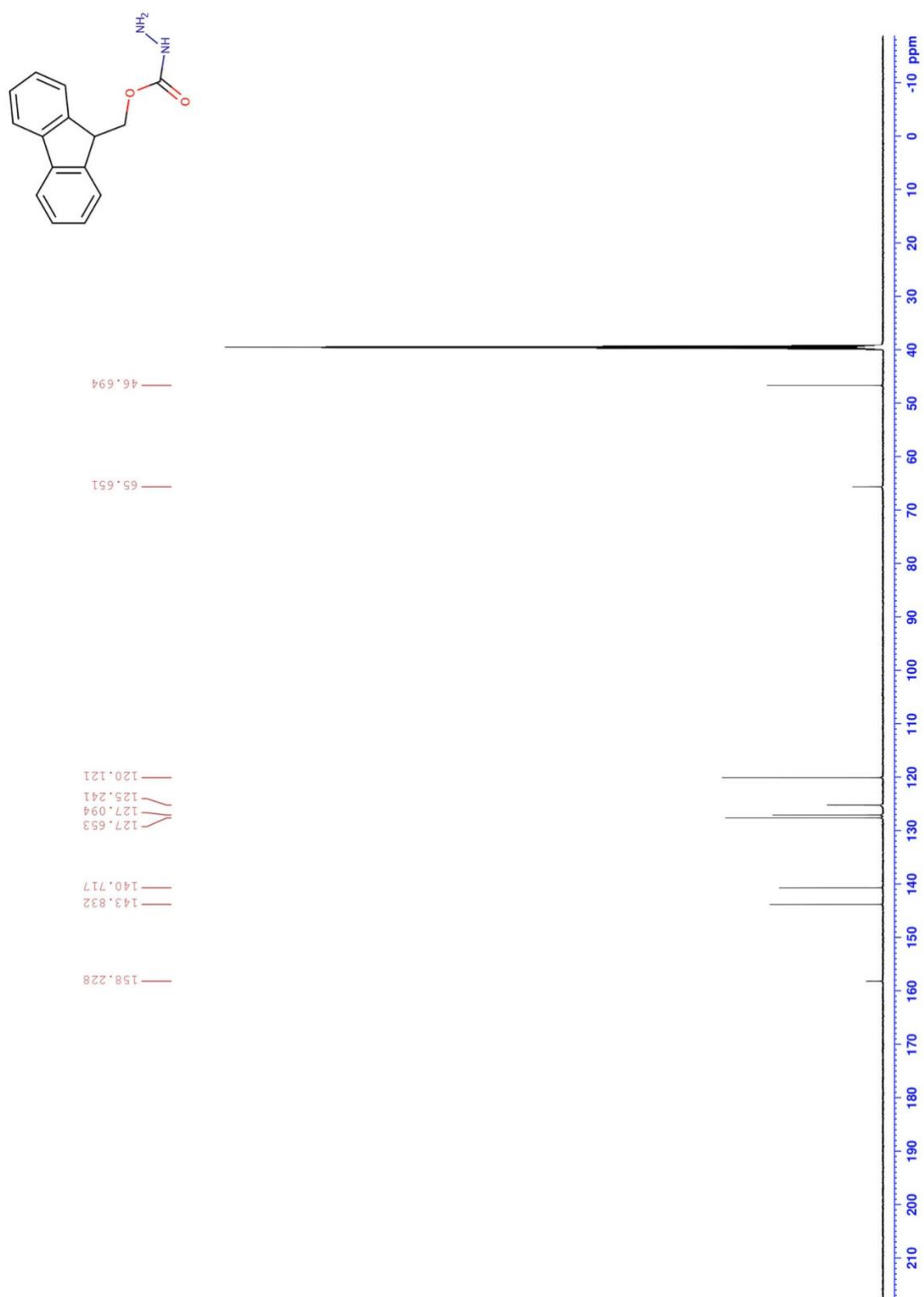
Tänuavaldus

Töö autor avaldab lugupidamist ja tänu enda juhendajatele Dr. Anu Ploomile (PhD) ja Dr. Anton Mastitskile (PhD), kes aitasid kaasa antud magistritöö valmimisele kõigi teadmistega. Kindlasti soovib autor tänada Rait Pallat ning Hegne Pupartit, kes olid igati toeks ja abiks.

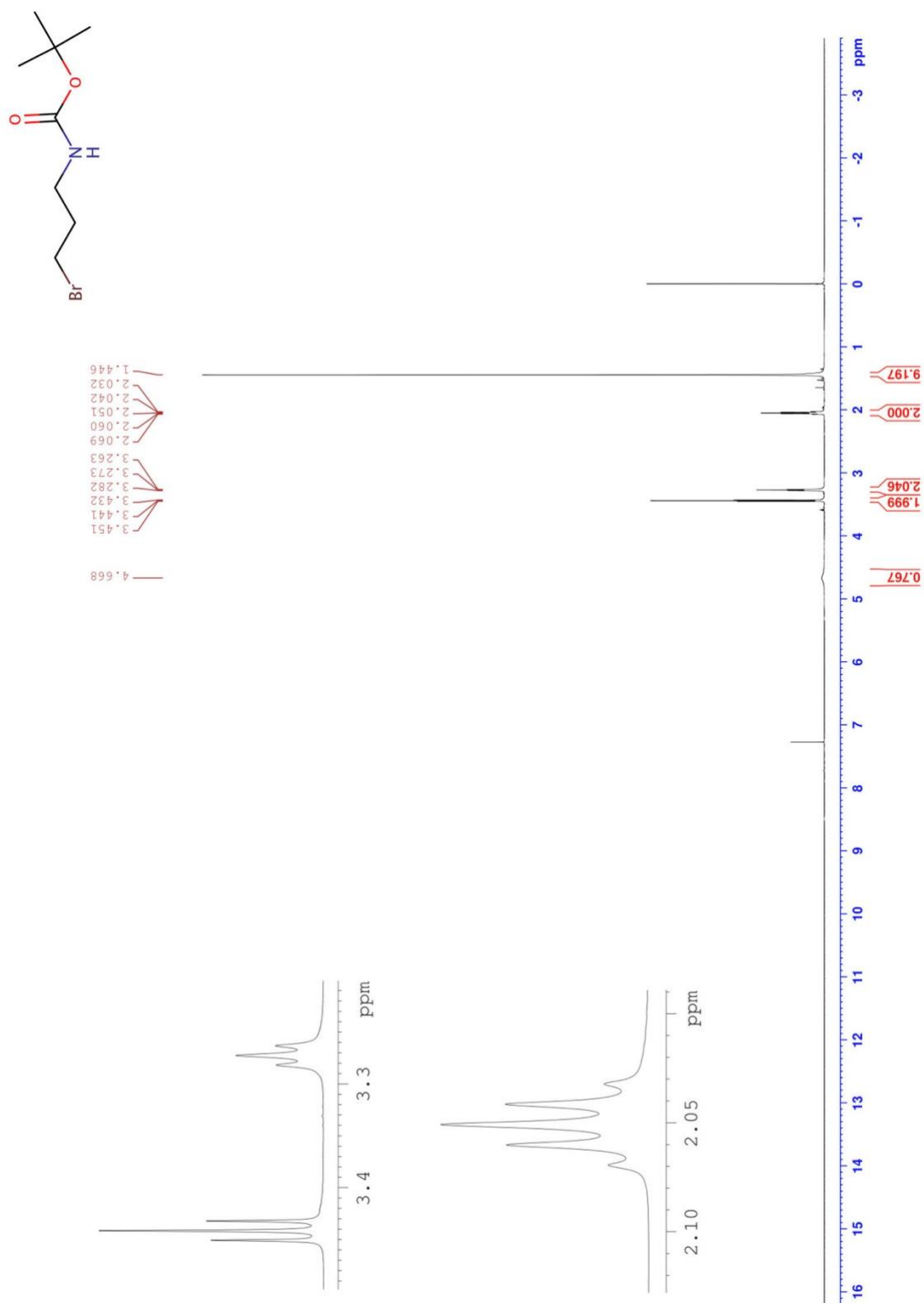
Samuti tänab autor oma perekonda igakülgse toetuse ning mõistmise eest ja orgaanilise õppetooli kolleege.

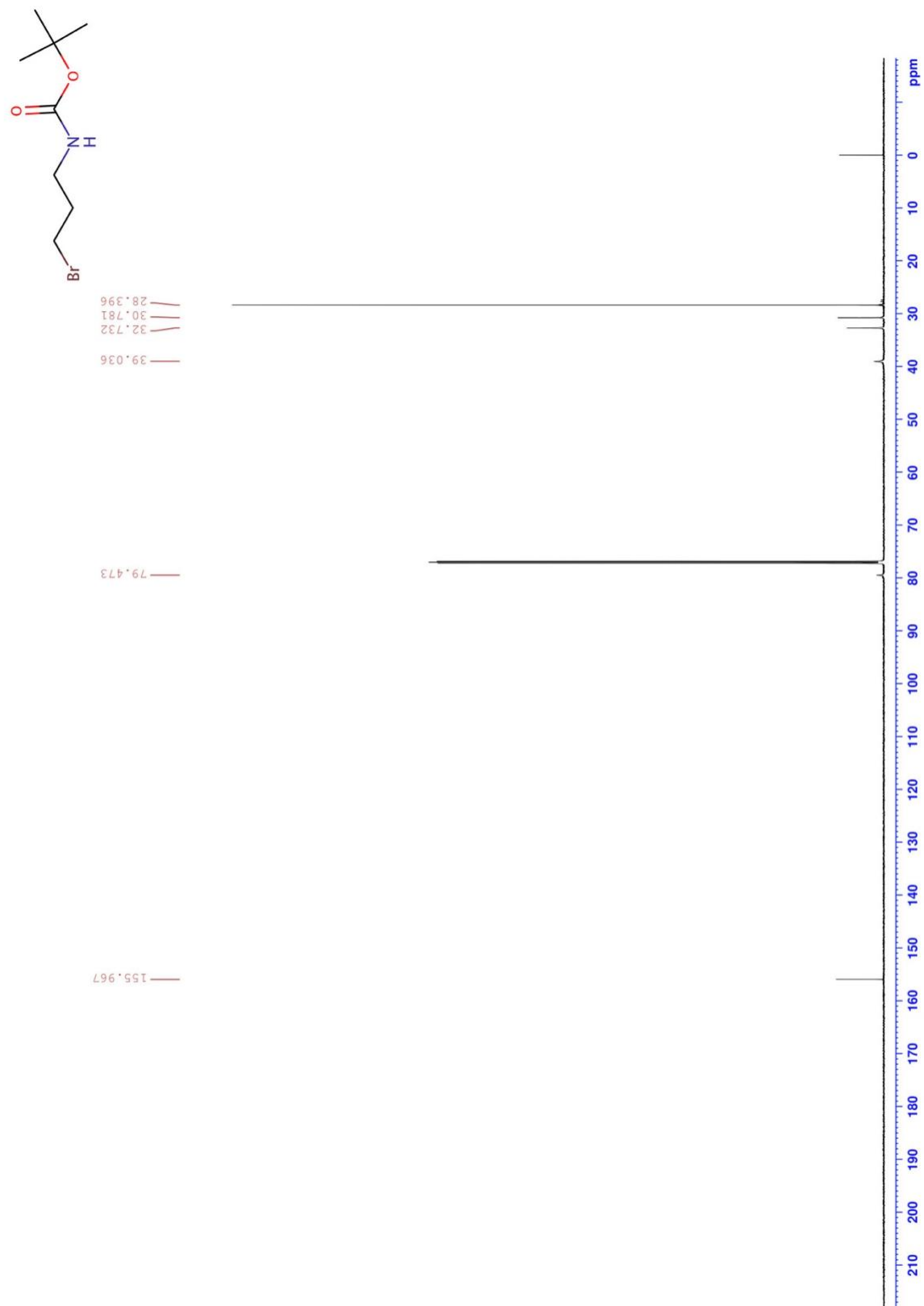
LISAD TMR spektrid

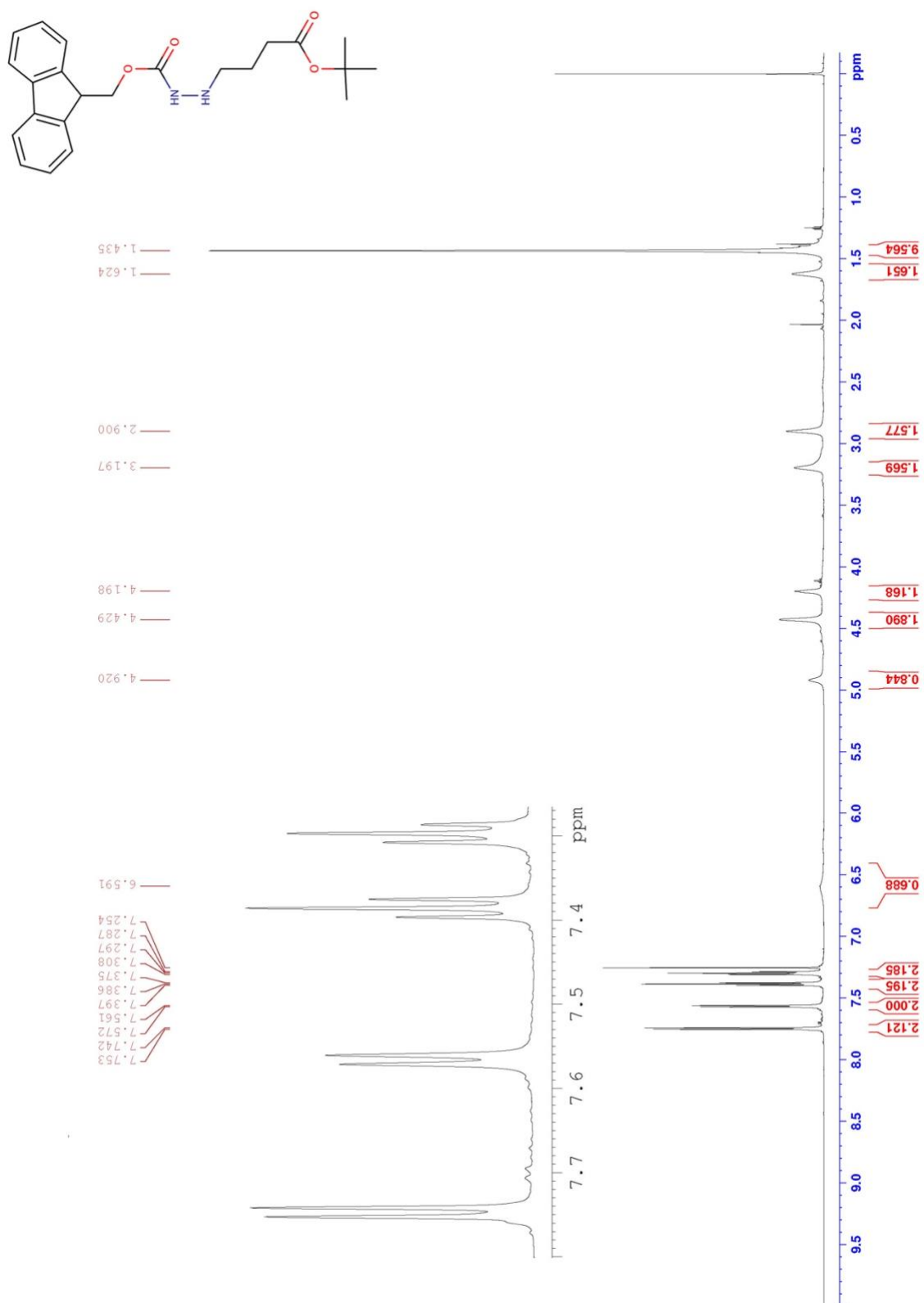


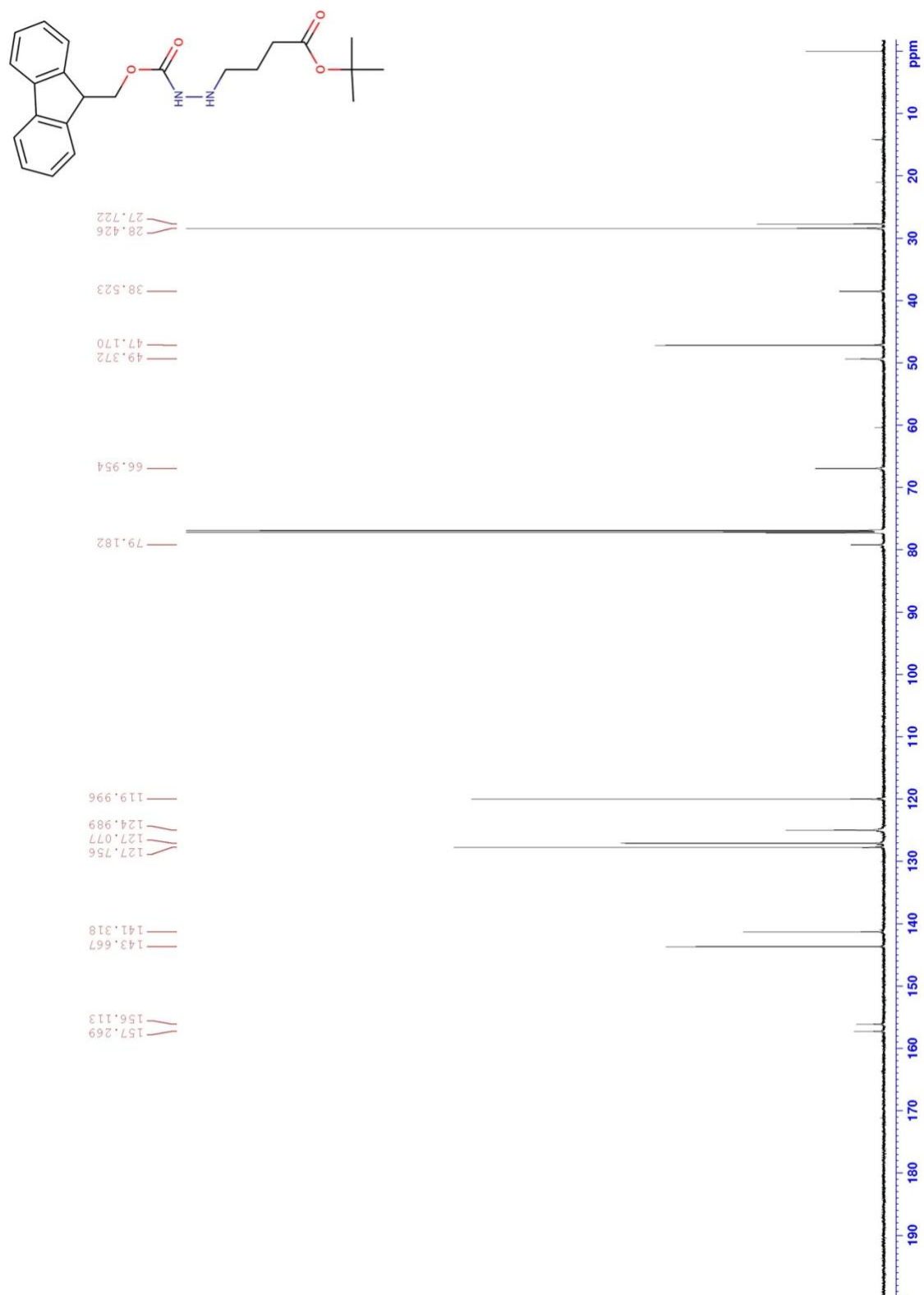


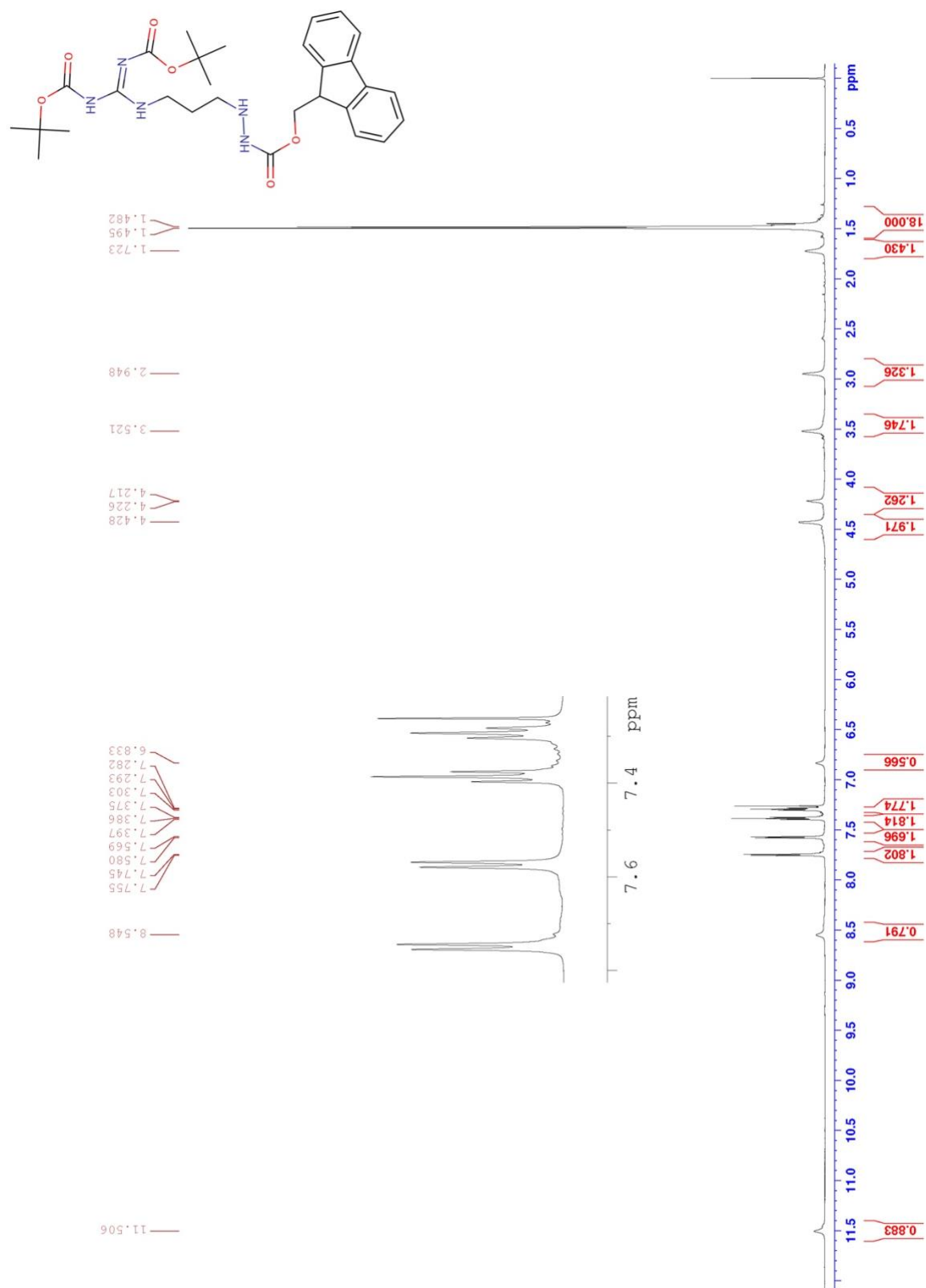
Lisa 3

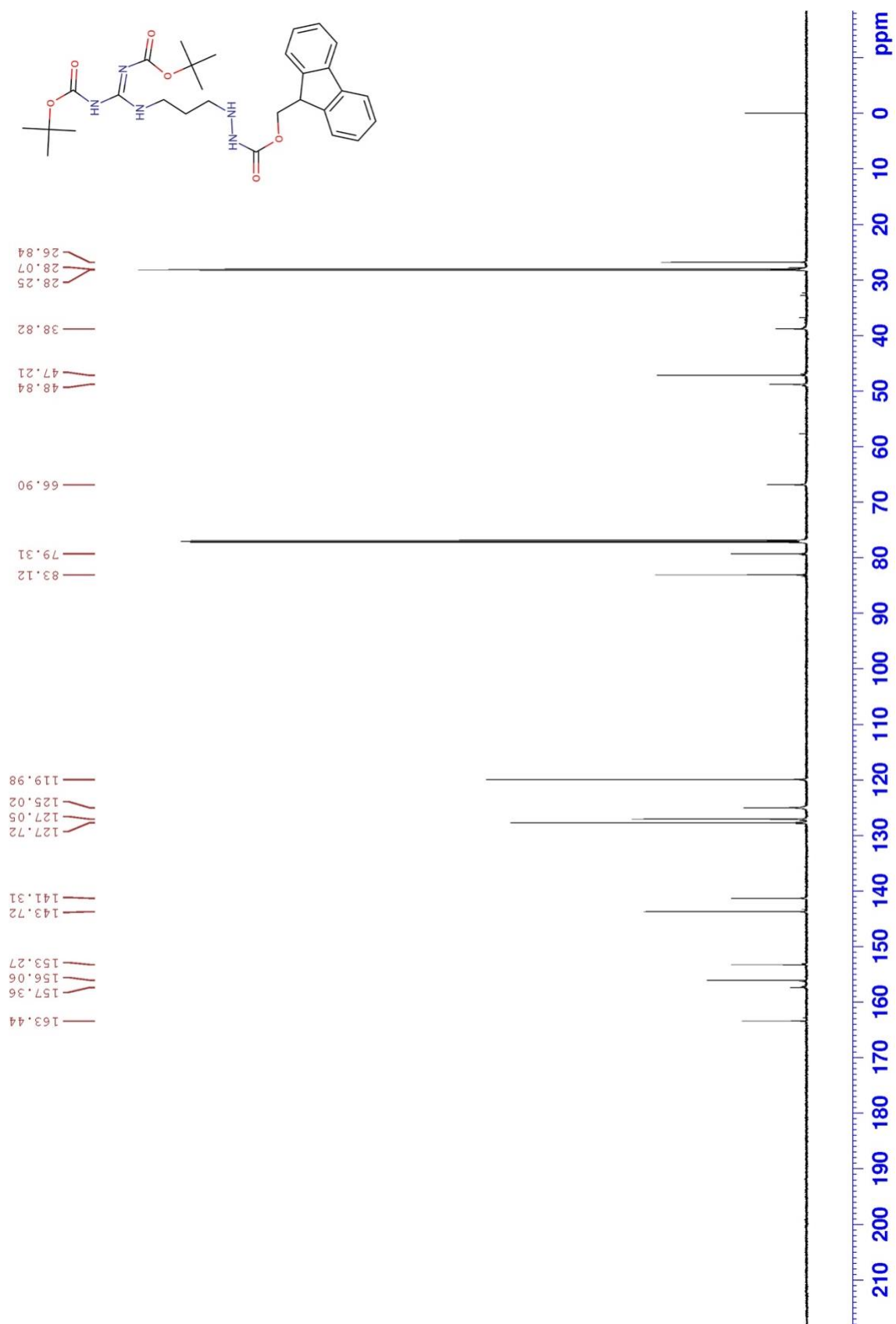


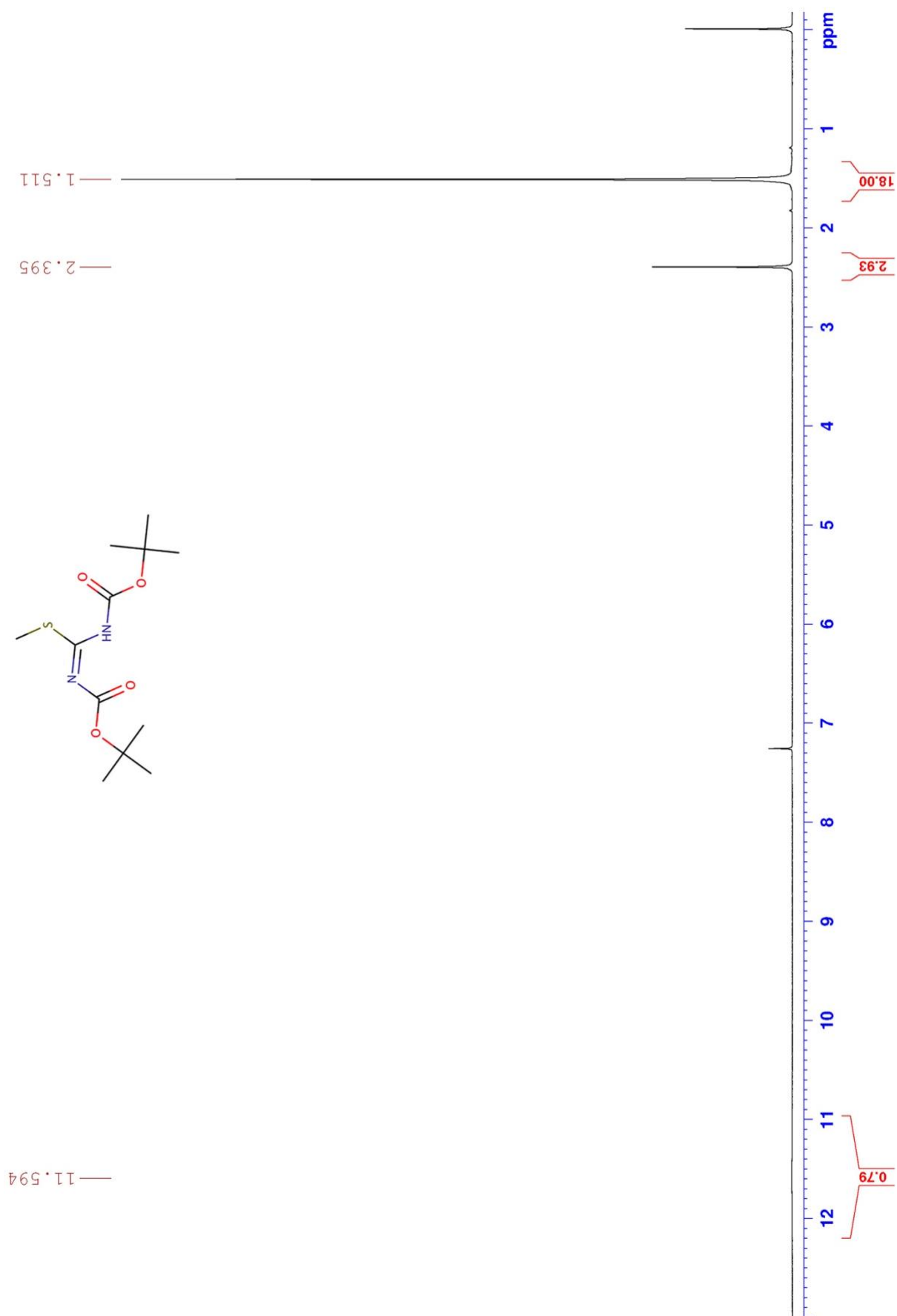


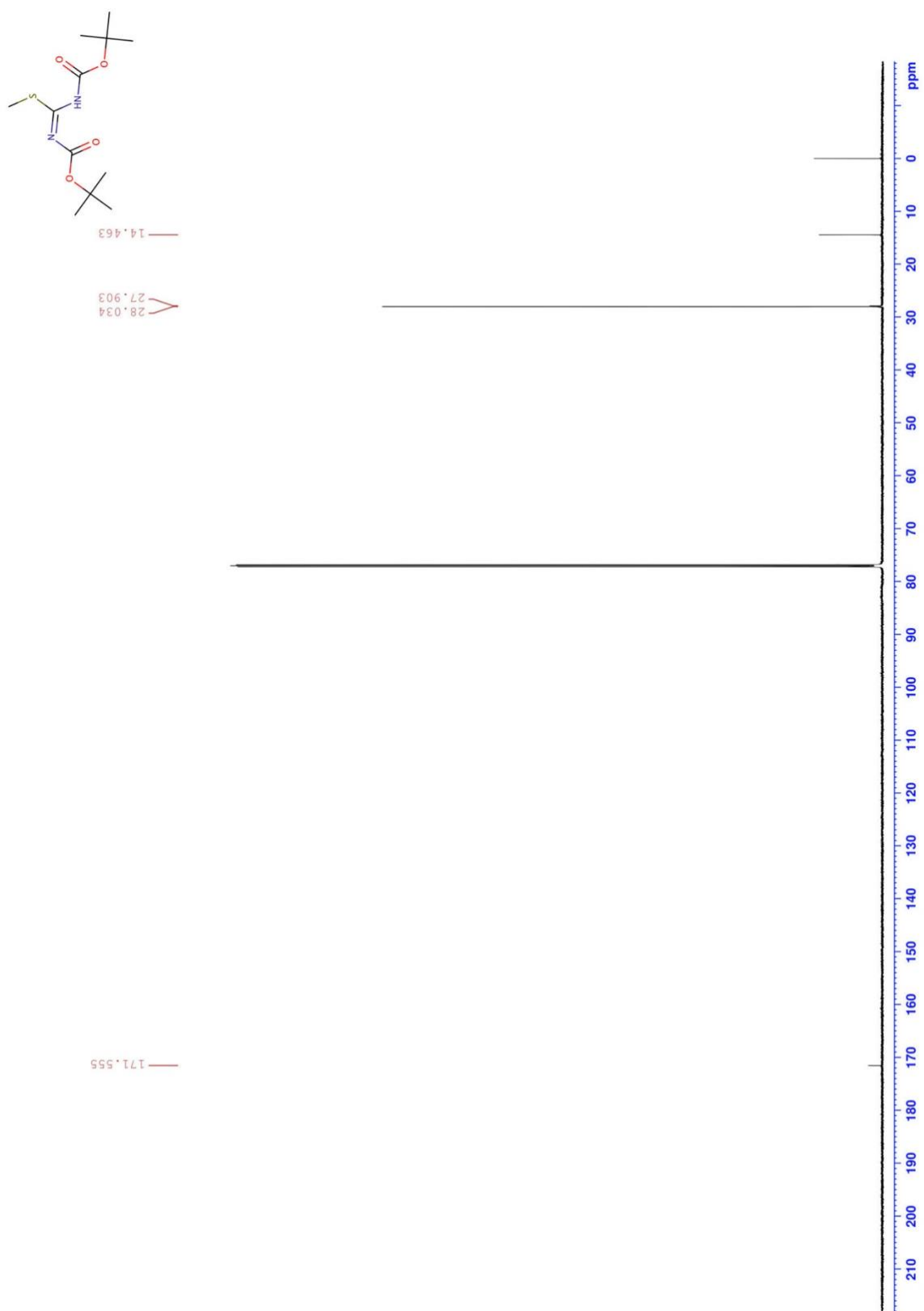


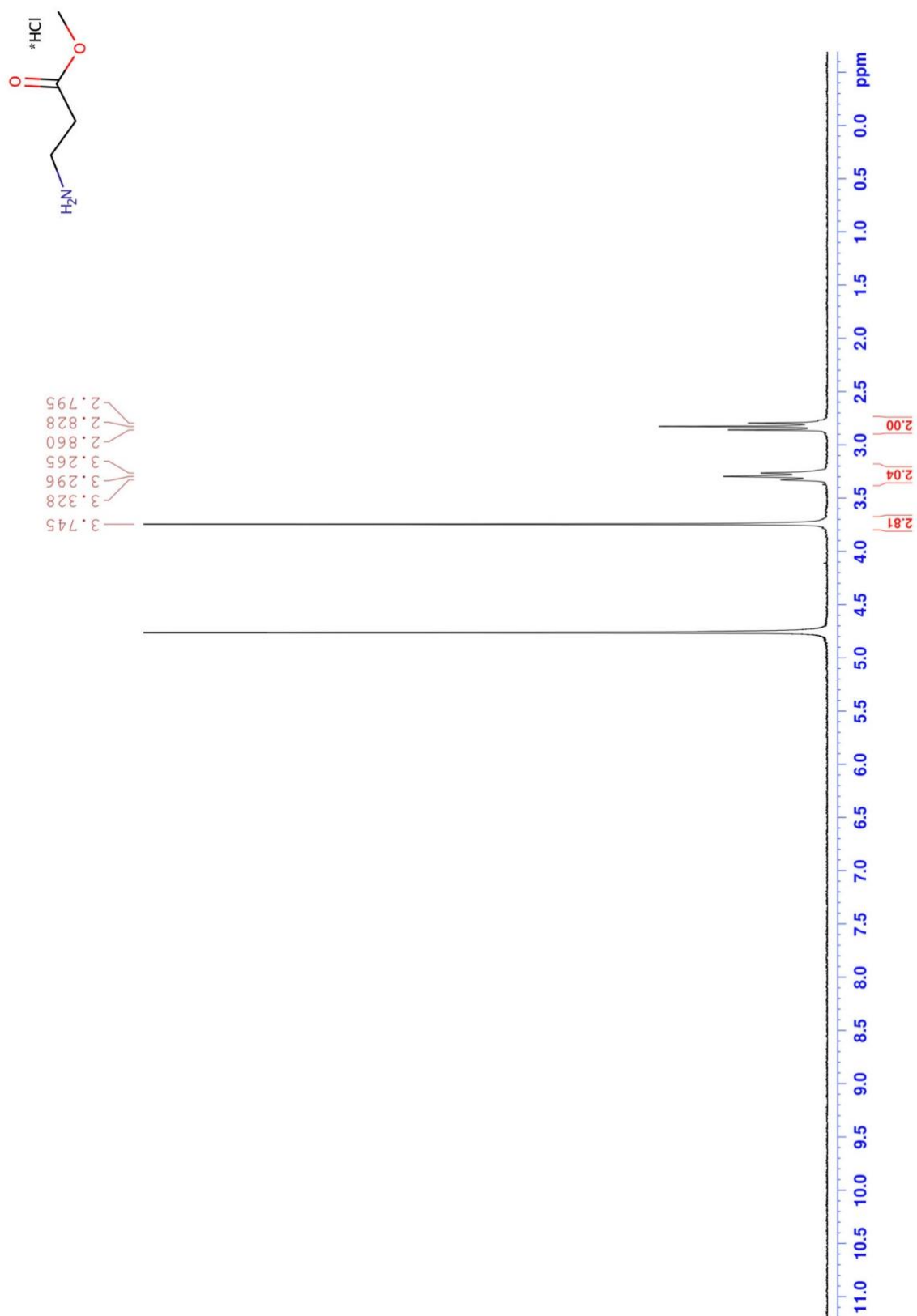


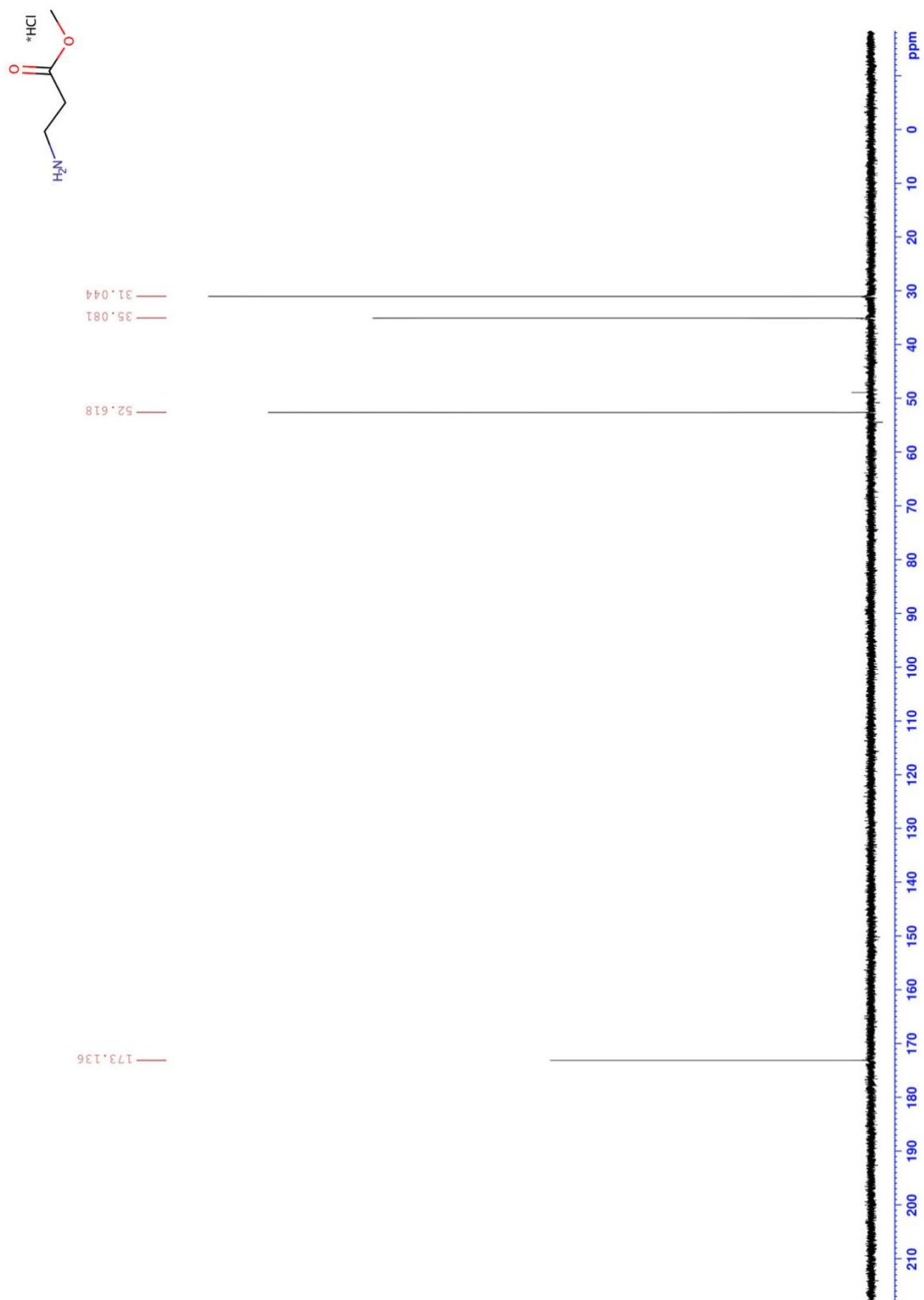


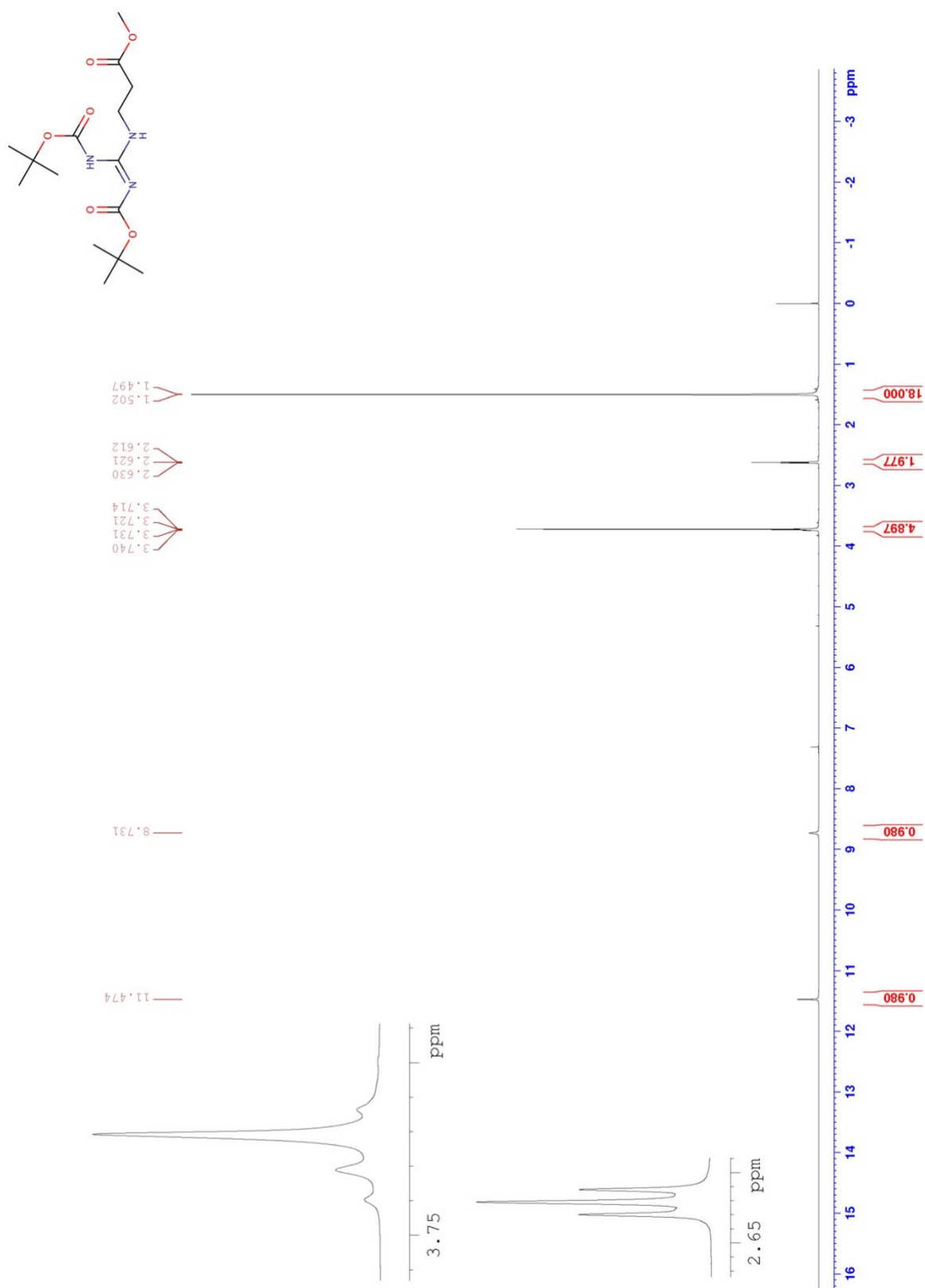


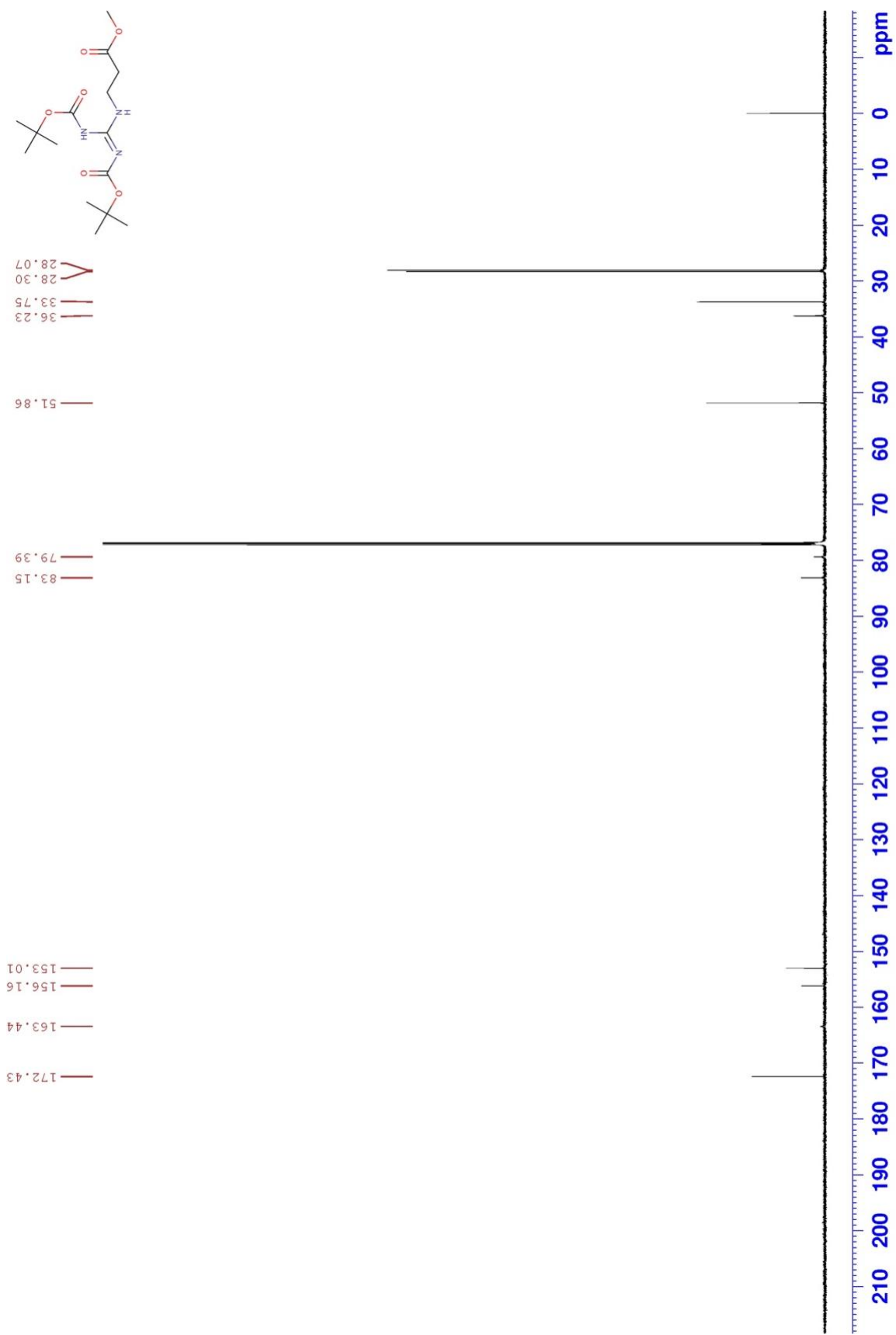


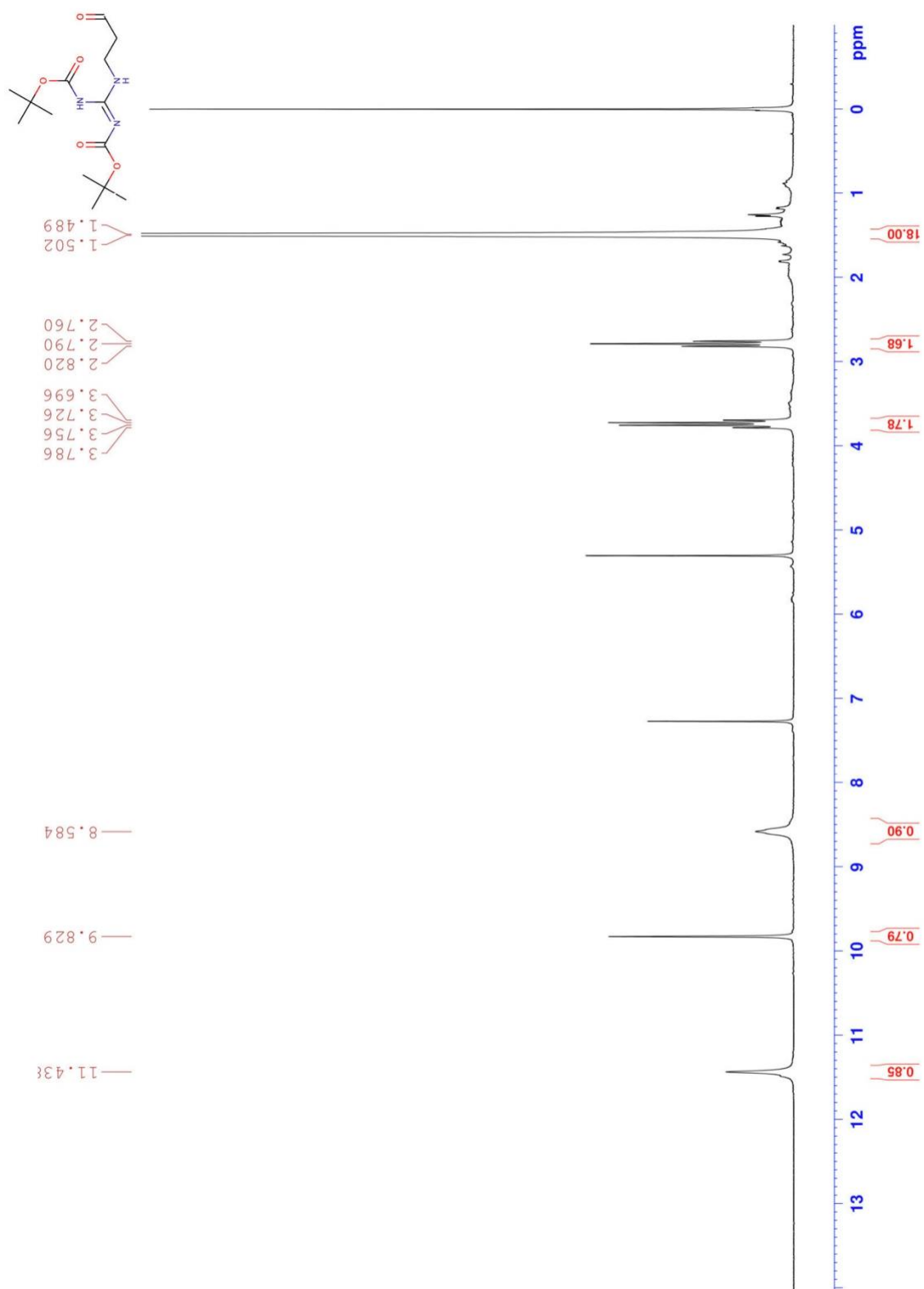


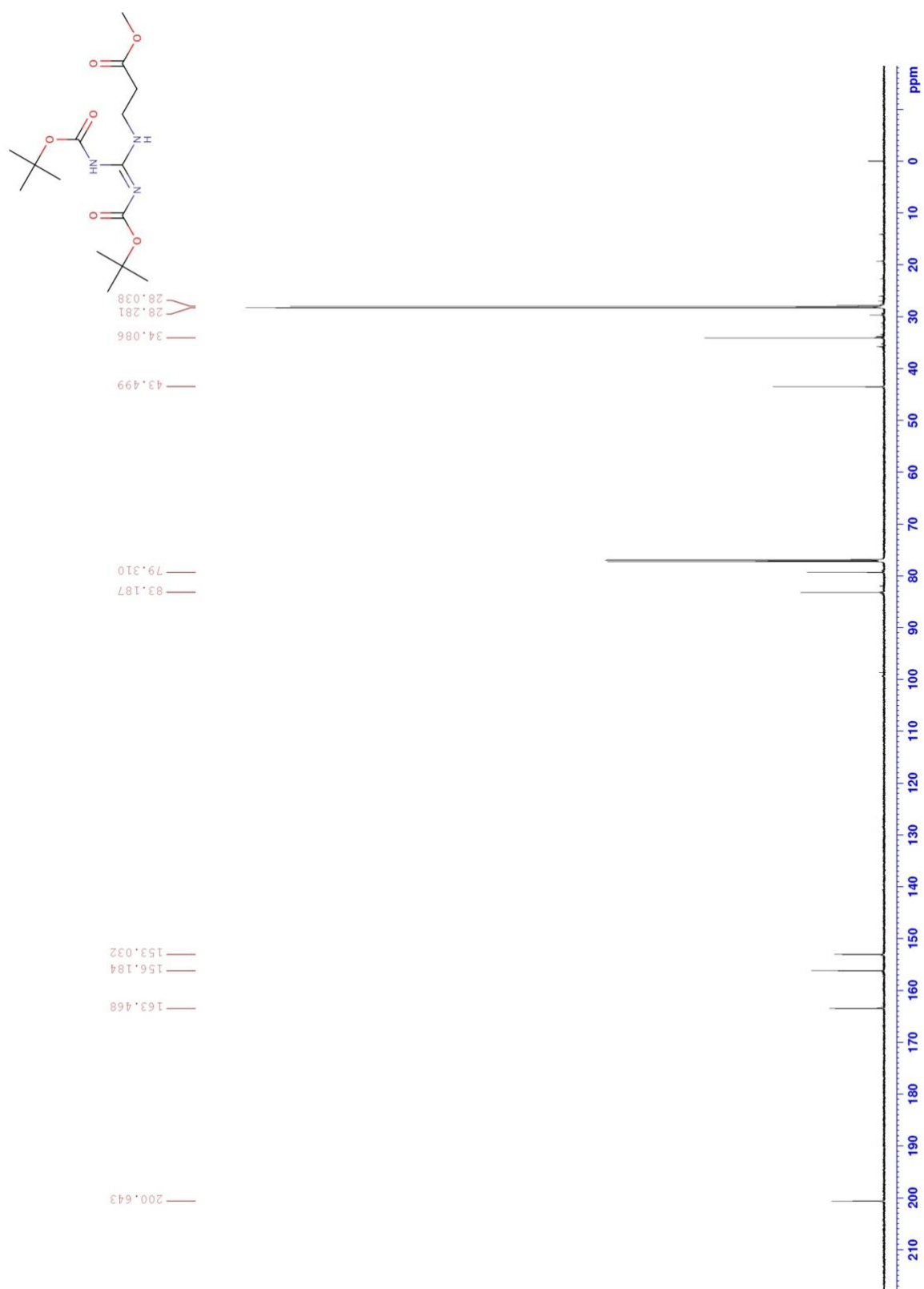


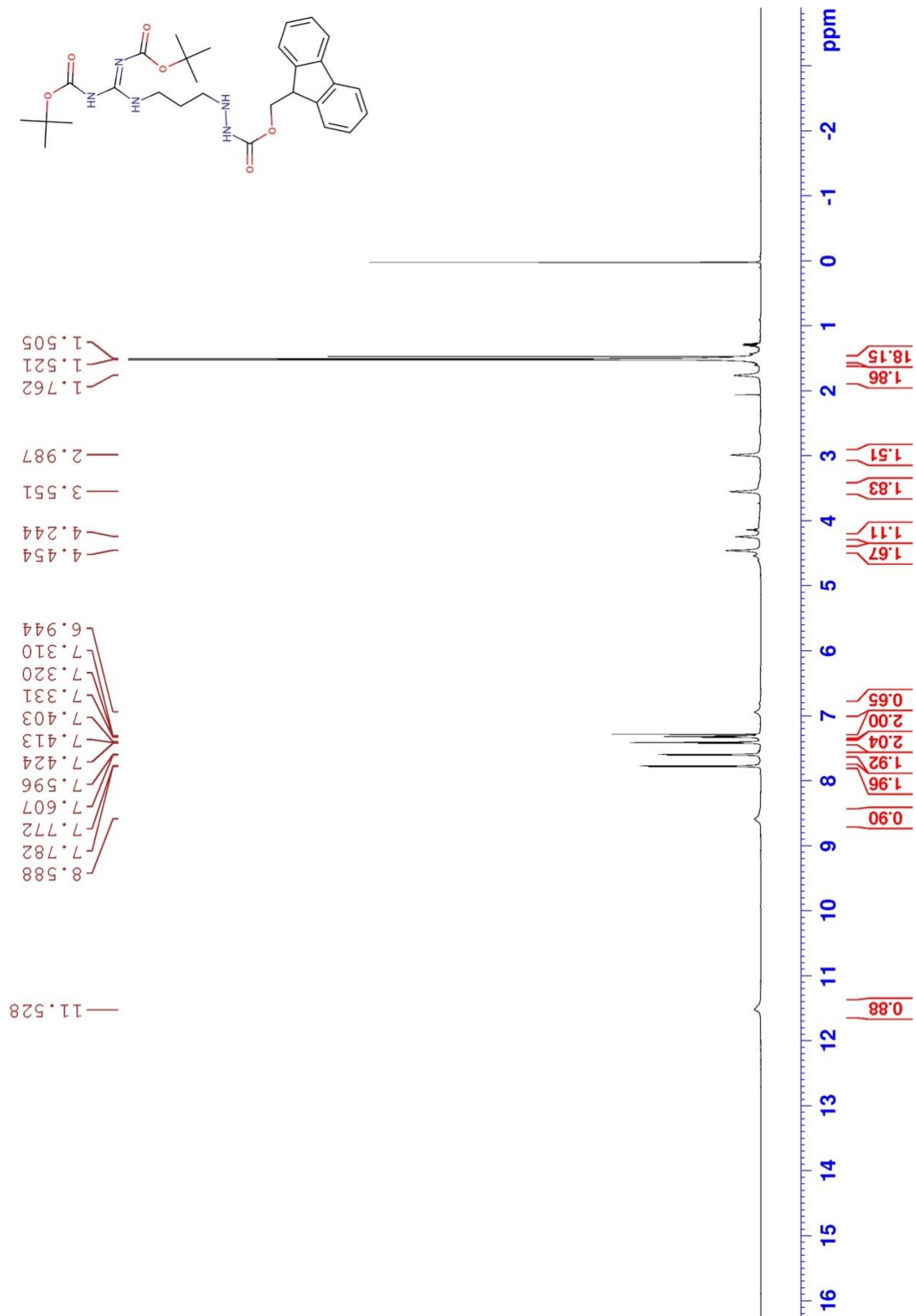


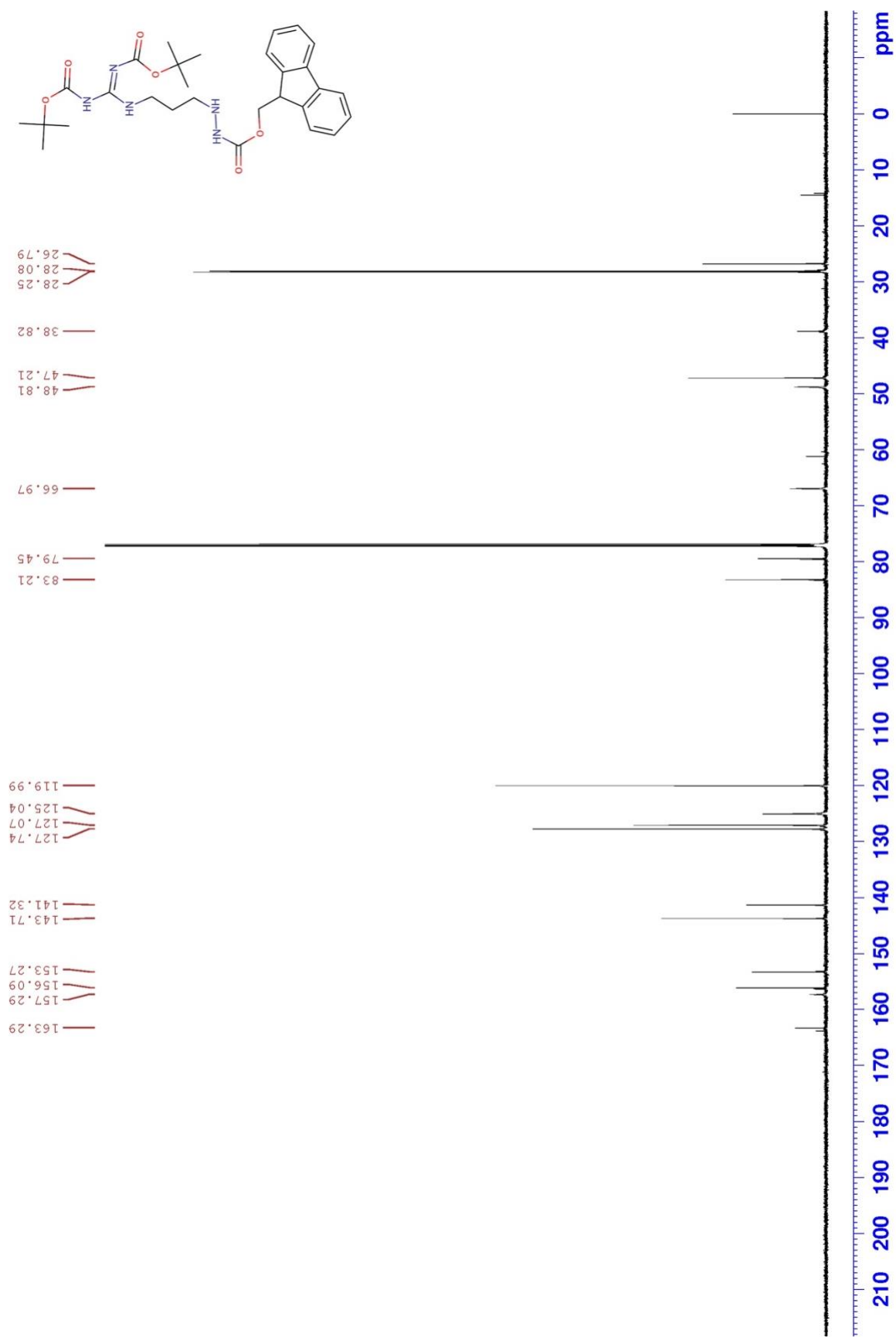












AsaArg prekursori sünteesiga seotud muud lisad

Lisa 19. Destillatsioonide kirjeldused

- a) NMP destillatsioon: 100 ml ümarkolbi kuumutati ja jahutati N₂ voolus. Seejärel lisati kolbi ~7 g CaH₂ ning valati peale 75 ml NMP-d. Kolb varustati püstjahutiga ja magnetsegajaga ning jäeti segama üleöö 60 – 65 °C juures. Seejärel kuumutati läbi destillatsiooni seadme osad, seade pandi kokku ning jahutati N₂ voolus. Destillatsiooni põhifraktsioon korjati 94 – 96 °C juures ning rõhul 21 torri. Saadi 60 ml kuiva NMP-d.
- b) Tolueeni destillatsioon: 250 ml tolueeni asetati kolbi koos metallilise Na ja kuumutati keemistemperatuuril inertses keskkonnas 1,5 h. Seejärel ühendati jahuti läbikuumutatud vastuvõtu kolviga, kuhu oli pandud mõni tükk metallilist Na.

Lisa 20. *N,N'*-di-Boc-*S*-metüülisotiourea süntees *N*-Boc-*S*-metüülisotiouureast

N-Boc-*S*-metoksüisotiourea (1 ekv; 1,758 g; 9,25 mmol) lahustati DCM-is (7 ml). Seejärel lisati di-*tert*-butüüldikarbonaati (1 ekv; 2 g; 9,25 mmol) ning tilgutati reaktsioonisegusse DiPEA (1,5 ekv; 1,79 g; 13,88 mmol). Reaktsioonil lasti toimuda toatemperatuuril segades üleöö. Toorprodukti puhastati kolonnkromatograafiliselt kasutades voolutina tolueeni ja tolueen:EA 9:1 segu.

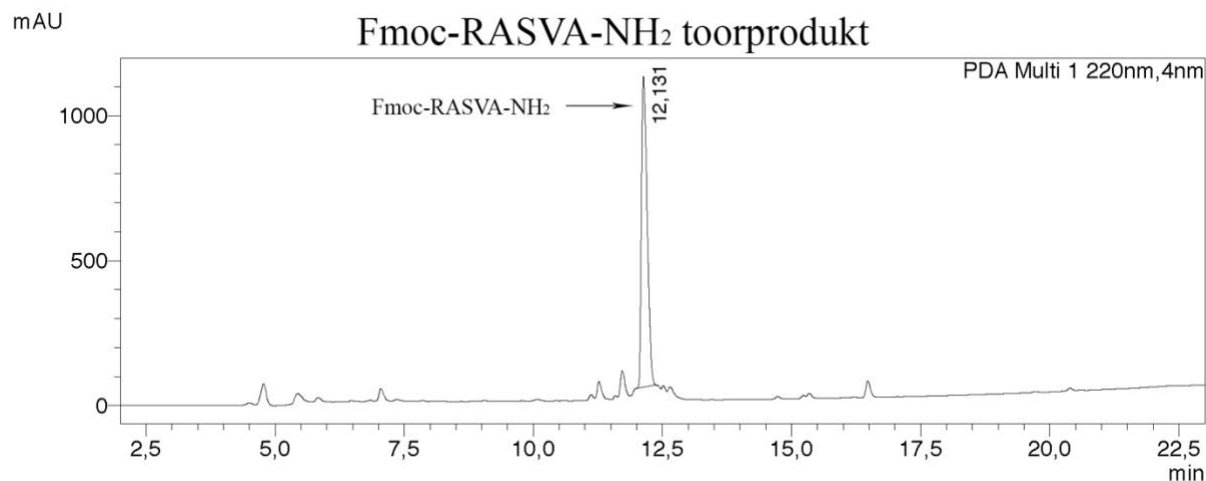
Saagis: 81%. TMR spektrid on vastavalt Lisa 9 ja Lisa 10 (vt 2.1.2.1).

H-asaRRASVA-NH₂ ja Fmoc-asaRF-NH₂ sünteesiga seotud lisad

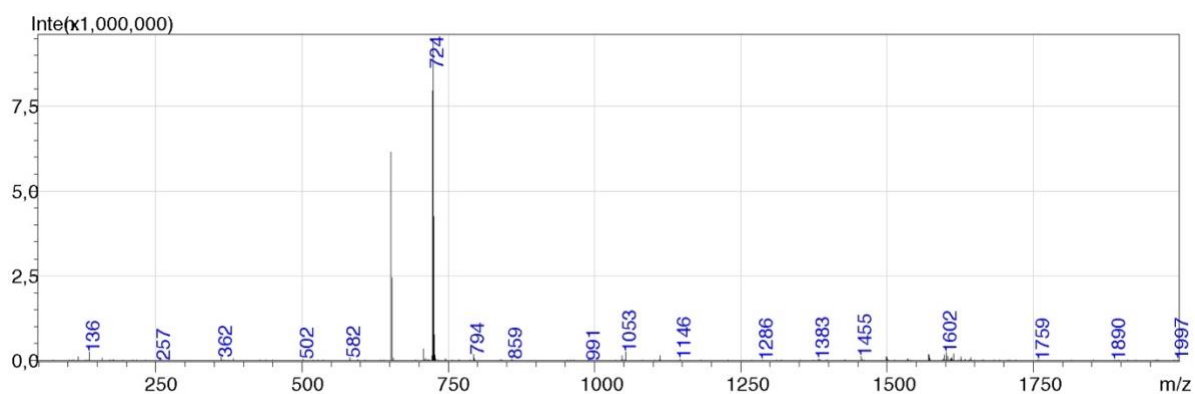
Lisa 21. **Tabel 6.** AsaRRASVA-NH₂ aminohapete sidumisreaktsiooni tingimused ja testide tulemused.

#	Aminohape	Aktivaator	ekv	n, mmol	Sidumine, KT	Fmoc- eemaldamine, KT	TLC
0	Fmoc-Rink-Amiid MBHA vaik	-	1	0,17	-	2+20 min, sinine	+
1	Fmoc-L-Ala- OH*H ₂ O	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	2+20 min, sinine	+
2	Fmoc-L-Val-OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	2+20 min, sinine	+
3	Fmoc-L-Ser(tBu)- OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	2+20 min, sinine	+
4	Fmoc-L-Ala- OH*H ₂ O	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, kollane	2+20 min, sinine	+
5	Fmoc-Arg(Pbf)- OH	TBTU/HOBt	3	0,51	1 h, sinine	2+20 min, sinine	-
	Fmoc-Arg(Pbf)- OH	TBTU/HOBt	5	0,85	2 h, sinine	-	-
	Fmoc-Arg(Pbf)- OH	PyOxim	5	0,85	2 h, sinine	-	-
	Fmoc-Arg(Pbf)- OH	COMU	5	0,85	2 h, kollane	-	+
6	AsaArg prekursor	BTC	4	0,68	24 h, kollane	2+20 min, sinine	+
7	-	-	-	-	-	2+20 min, sinine	+

Lisa 22. Fmoc-RASVA-NH₂ toorprodukti kromatogramm ning massispekter

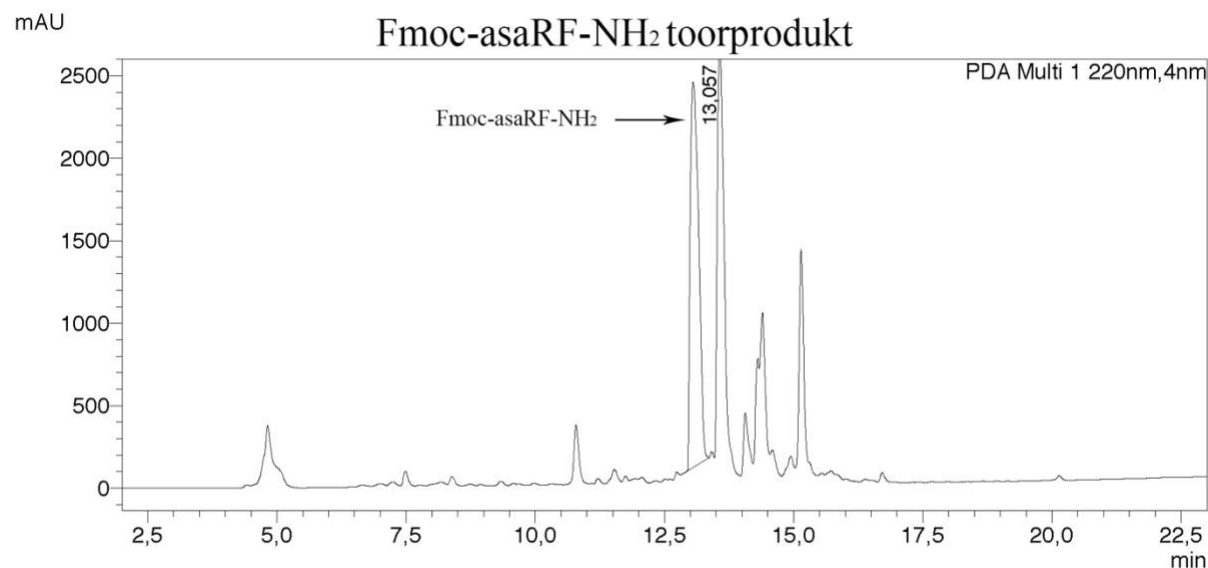


Toorpeptiid Fmoc-RASVA-NH₂ lahustati 5% ACN-i lahuses. HPLC analüüsimiseks kasutati 5 – 80% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 19 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 2. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

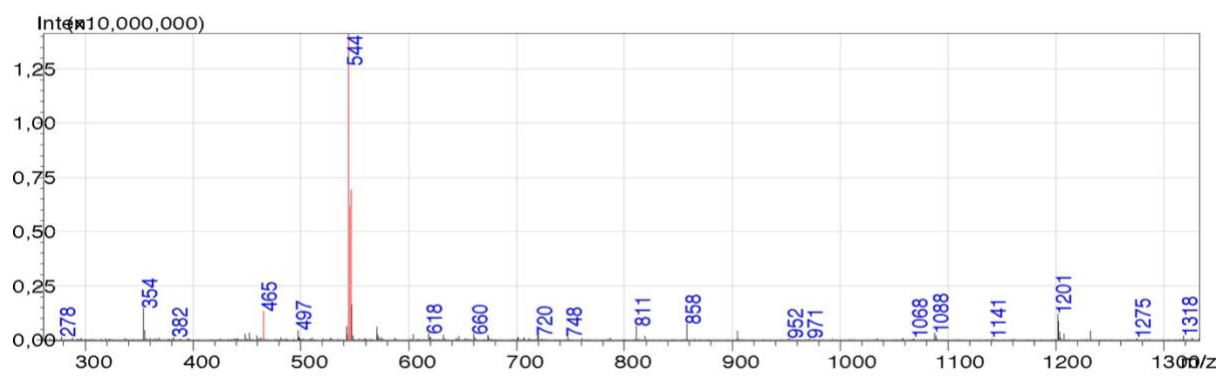


Fmoc-RASVA-NH₂ mass: [M]=724 m/z; [M+H]= 725 m/z

Lisa 23. Fmoc-asaRF-NH₂ toorprodukti kromatogramm ning massi-spekter

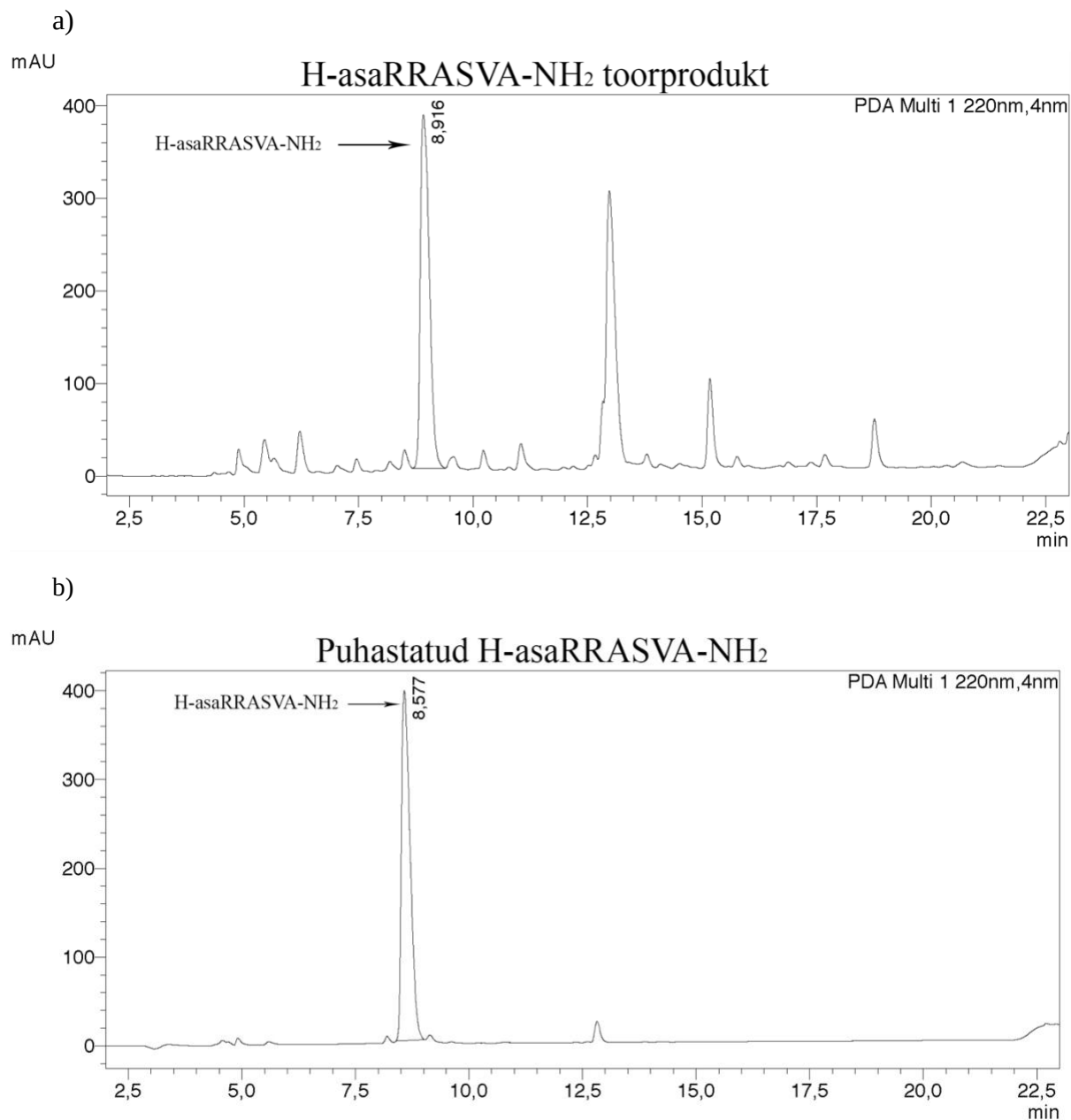


Toor-dipeptiid Fmoc-asaRF-NH₂ lahustati 20% ACN-i lahuses. HPLC analüüsiks kasutati 10 – 80% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 19 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 2. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

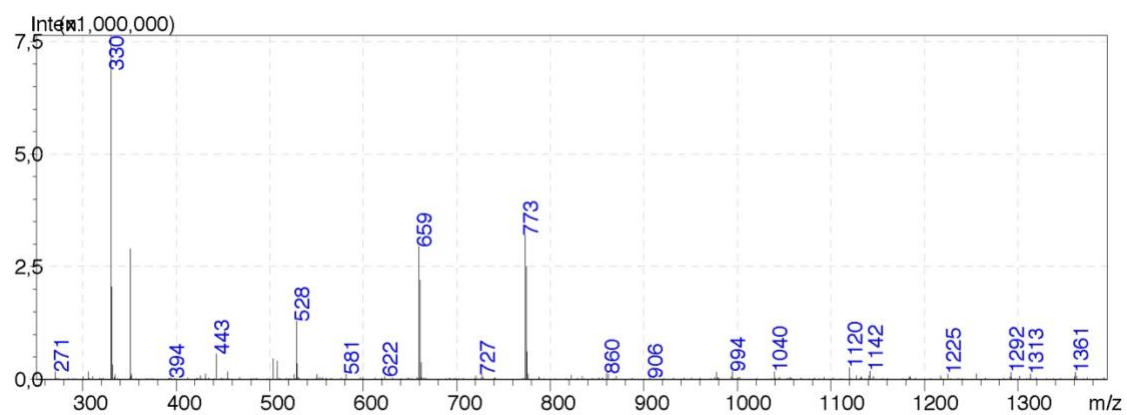


Mudelpeptiidi mass: [M]=544 m/z; [M+H]=545 m/z; [M+2H]=546 m/z

Lisa 24, H-asaRRASVA-NH₂ toor- ja puhastatud produkti kromatogrammid ja massi-spekter



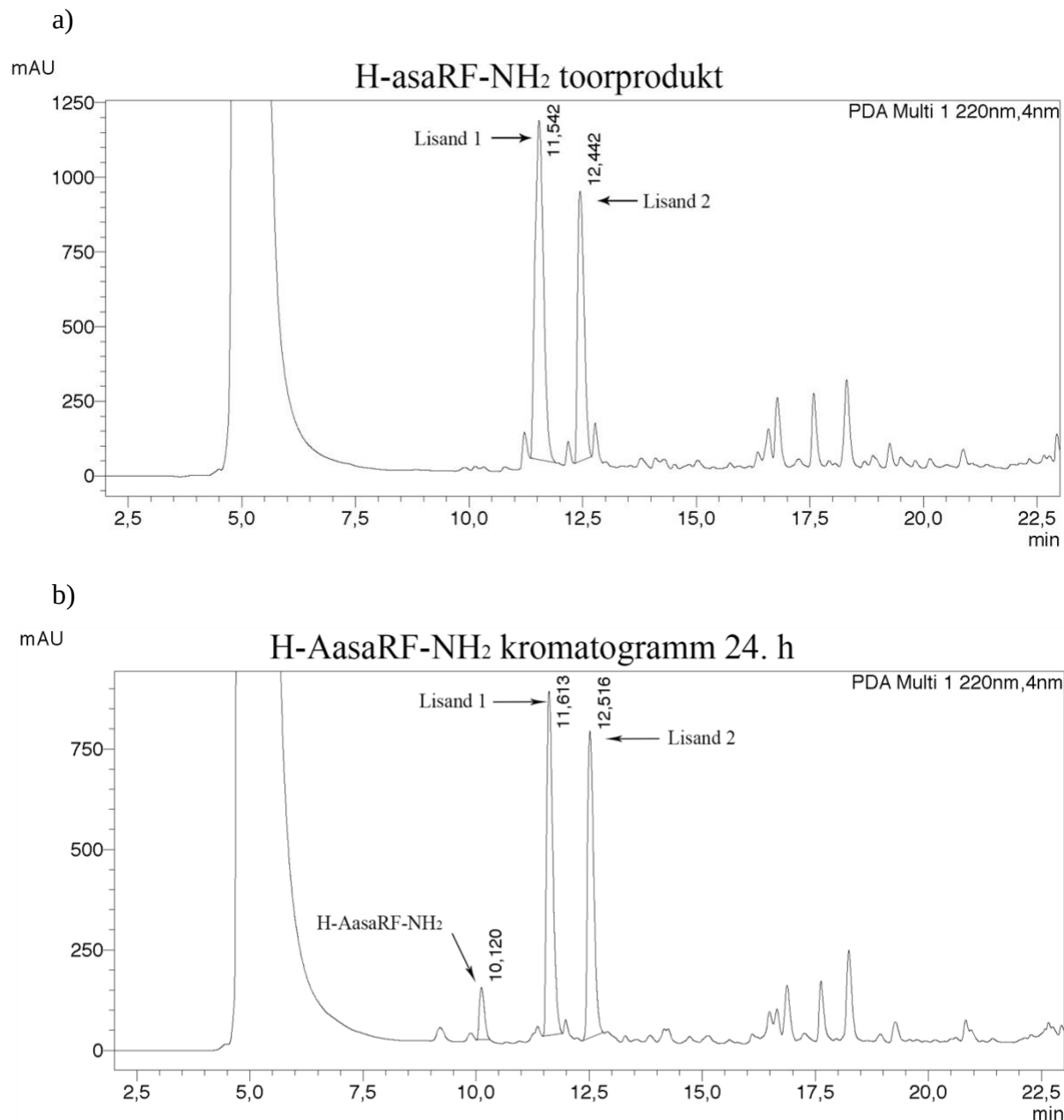
Toor- ja puhastatud peptiidi H-asaRRASVA-NH₂ lahustati 5% ACN-i lahuses. HPLC analüüsimiseks kasutati 5 – 20% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 19 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 2. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.



H-asaRRASVA-NH₂ mass: [M]=659 m/z; [M/2+H]=330 m/z

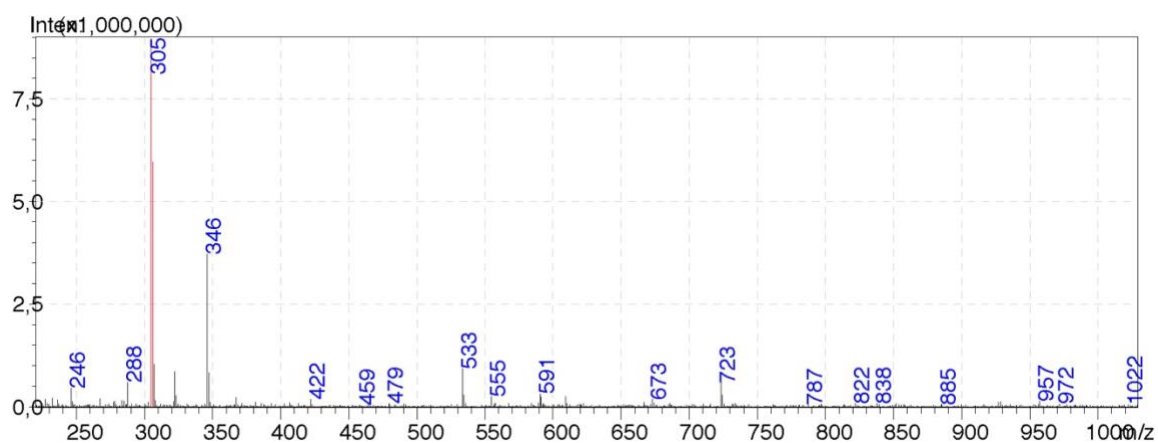
Kineetiliste mõõtmistega seotud lisad

Lisa 25. H-asaRF-NH₂ toorprodukt ja H-AasaRF-NH₂ 24. h reaktsioonisegu kromatogrammid ning massi-spektrid

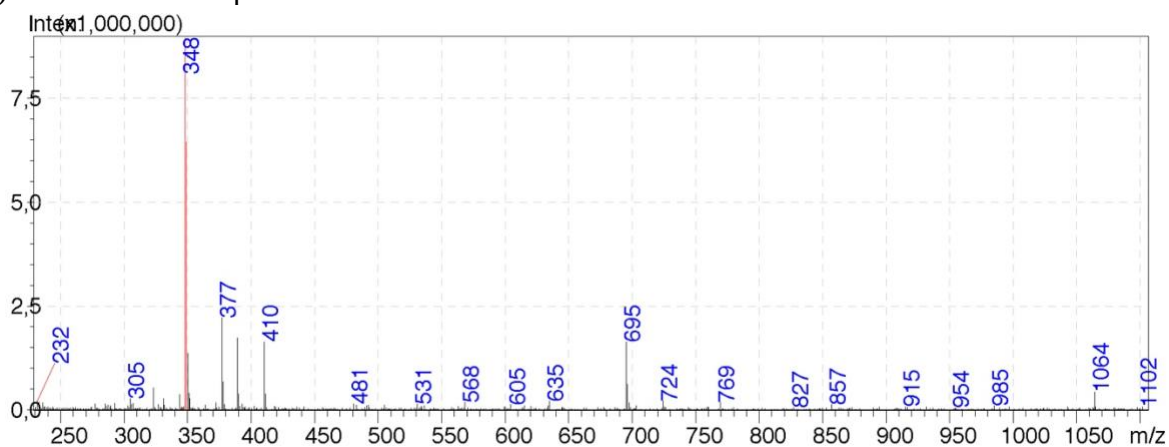


Toor-asa-peptiidide H-asaRF-NH₂ ja H-AasaRF-NH₂ HPLC kromatogrammid: a) enne reaktsiooni algust ning b) reaktsiooni 24. tunnil. Asa-peptiidid lahustati 20% ACN-i lahuses. HPLC analüüsil kasutati 5 – 35% B gradienti, kus puhver A oli 0,1% TFA vesilahus ja puhver B oli 0,1% TFA ACN-is. Proove elueeriti 19 minutit voolukiirusega 1 ml/min. 40 µl proovid süstiti 2. minutil ja detekteeriti lainepikkusel 220 nm.

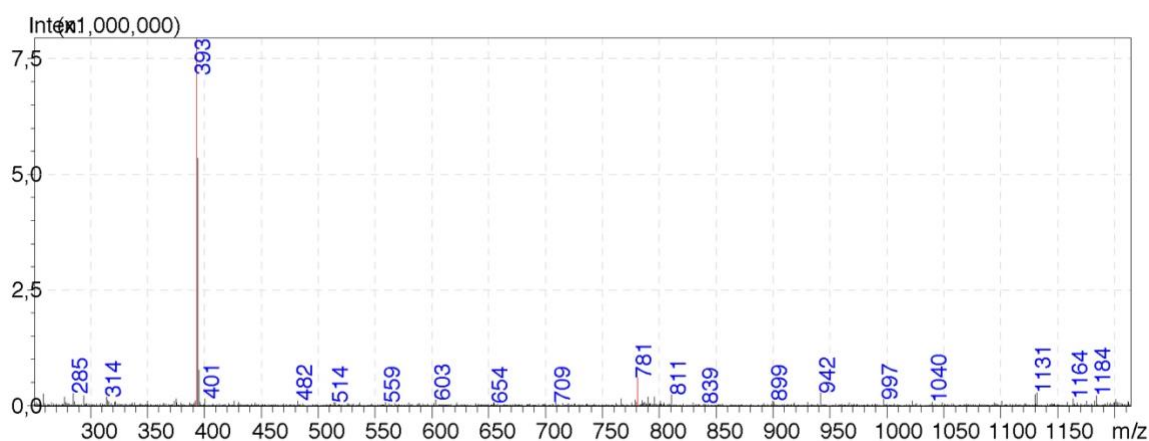
c) Lisand 1 massispekter



d) Lisand 2 massispekter



e) H-AasaRF-NH₂ massispekter



H-AasaRF-NH₂ mass: $[M]=392\ m/z$; $[M+H]=393\ m/z$

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Alla Troska,

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

“Asa-arginiini sisaldavate asa-peptiidide süntees”,

mille juhendajad on Anton Mastitski (PhD) ja Anu Ploom (PhD),

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni 03.06.2021 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

27.05.2019, Tartu