

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Marju Vestman

**ARC-Lum(Fluo) ühendite sünteesimine suures skaalas**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Füüsika, keemia ja materjaliteadus

Keemia eriala

Juhendaja: kaasprofessor Erki Enkvist, PhD

Tartu 2022

## Sisukord

1. Lühendid .....	4
2. Sissejuhatus.....	5
3. Kirjanduse ülevaade.....	7
3.1. Luminestsents.....	7
3.2. Fotoluminestseeruvate ainete omadused .....	7
3.2.1. Försteri tüüpi resonantne energiaülekanne.....	7
3.2.2. Fotoluminestsentsi mõõtmine .....	8
3.3. Tiofeeni ja selenofeeni sisaldavad molekulid .....	9
3.4. Oligoproliniiahelad.....	10
3.5. ARC-Lum(Fluo)-de rakendused .....	10
4. Reagentide, aparatuuri ja meetodite kirjeldus.....	12
5. Eksperimentaalne osa.....	14
5.1. Orgaaniline süntees .....	14
5.1.1. Boc-di-L-proliinmetüülestri süntees .....	14
5.1.1.1. Meetod 1.....	14
5.1.1.2. Meetod 2.....	14
5.1.2. Boc-di-L-proliini süntees .....	15
5.1.3. Di-L-proliinmetüülester-soolade süntees .....	15
5.1.3.1. Di-L-proliinmetüülester-TFA süntees.....	15
5.1.3.2. Di-L-proliinmetüülester-pTs süntees .....	15
5.1.3.3. Di-L-proliinmetüülester-HCl süntees.....	16
5.1.4. Boc-tetra-L-proliinmetüülestri süntees.....	16
5.1.4.1. Meetod 1.....	16
5.1.4.2. Meetod 2.....	16

5.1.4.3. Meetod 3.....	17
5.1.4.4. Meetod 4.....	17
5.1.5. L-proliinbensüülestri süntees .....	17
5.1.6. Boc-di-L-proliinbensüülestri süntees .....	18
5.1.7. Di-L-proliinbensüülester-HCl süntees .....	18
5.1.8. Boc-tetra-L-proliinbensüülestri süntees .....	18
5.1.9. Boc-tetra-L-proliini süntees .....	19
5.1.10. 5-(2-amino-4-pürimidinüül)-2-tiofeenkarboksüülhappe süntees .....	19
5.1.11. 5-(2-amino-4-pürimidinüül)-2-tiofeenkarb.happe piperasiinamiidi süntees.....	20
5.1.12. Ainete 5 ja 6 süntees.....	20
5.1.13. Ainete 5d ja 6d .....	21
5.1.14. ARC-1491 süntees.....	21
5.1.15. ARC-1492 süntees.....	21
5.2. Sünteesitud ühendite iseloomustamine .....	21
5.2.1. Ergastus- ja emissioonispektrite mõõtmine.....	21
5.2.2. Luminesentssignaali kustumise mõõtmine.....	22
6. Tulemuste arutelu.....	24
7. Kokkuvõte.....	29
8. Summary .....	31
9. Kirjanduse loetelu .....	32
10. Lisad.....	34
11. Infoleht.....	37
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	38

## 1. Lühendid

5-TAMRA-SE	5-karboksütetrametüülrodamiin, suktsiinimidüülester
ARC	adenosiini analoogist ja arginiine sisaldavast peptiidist koosnev molekul või üldiselt Asko Uri grupis sünteesitud ühend
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DMF-DMA	N,N-dimetüülformamiid dimetüül atsetaal
DMSO	dimetüülsulfoksiid
EA	etüülatsetaat
EDC	1-etüül-3-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiid
FRET	Fösteri tüüpi resonantne energiaülekanne
HBTU	O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat
HOBt	hüdrosübensotriasool
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
LCD	vedelkristallkuvar
LED	valgusdiod
MS	massispektromeetria
MTBE	metüültertbutüüleeter
NMM	N-metüülmorfoliin
OLED	orgaaniline valgusdiod (ingl <i>organic light emitting diode</i> )
PLQY	fololuminestsentsi kvantsaagis (ingl <i>photoluminescence quantum yield</i> )
PVA	polüvinüülalkohol
PyAOP	(7-asabensotriasool-1-üloksü)tripürrolidinofosfoon heksafluorofosfaat
TEA	trietüülamiin
TFA	trifluoroäädikhape
TLC	õhukese kihi kromatograafia
TMR	tuumamagnetresonants
TMS	tetrametüülsilaan
UV	ultraviolet-

## 2. Sissejuhatus

ARC-Lum(Fluo) ühendid on molekulid, mis koosnevad väävlit või seleeni sisaldavast fosforestseeruvast osast, fluorestsentsvärvist ja neid ühendavast vahelulist ehk linkerist, milleks on tavaliselt peptiidiahel. ARC-Lum(Fluo) ühendeid on Asko Uri grupis uuritud mitmetel eesmärkidel: osa ARC-Lum(Fluo) ühendeid on uuritud bisubstraatsete proteiinkinaasiinhibiitoritena, teisi OLED-ites ja hapnikusensorites kasutamise eesmärgil. [1–4]

OLED-ekraanidel on LED- ja LCD-ekraanide ees mitmeid eeliseid (kiirem reageerimisaeg, realistlikumad värvid, energiasäästlikkus ning võimalus valmistada läbipaistvaid, painduvaid ja kumeraid ekraane). Varasemalt on OLED-ekraanide laialdast kasutuselevõttu piiranud nende kallis hind. Tänapäeval on OLED-ekraanid aga konkurentsivõimeline tehnoloogia LCD-, mini-LED- ja mikro-LED-ekraanide kõrval. OLED-ide arendamise peamiseks katsumusteks on ekraani sissepõlemise vältimine, eluea pikendamine ja piisava valgustugevuse saavutamine. [5,6]

Luminestsentsi kvantsaagise suurendamiseks püütakse OLED-ites maksimaalselt ära kasutada tripletsete olekute energiat. Ainult fluorestseeruvaid ühendeid sisaldavate OLED-ite efektiivsuse piir on 25%, kuid tripletsete olekute kasutamisega on võimalik saavutada kuni 100% efektiivsus. Elektrilise ergastuse tõttu tekib OLED-tes tripletset olekut kolm korda rohkem kui singletset. Seepärast on vaja tripletsete olekute energia muuta valguseks. Üks võimalus selleks on kanda üle FRET kaudu valgust emiteerivatele singletsetele olekutele. [4]

ARC-Lum(Fluo) ühendid on molekulid, mis koosnevad doonor- ja aktseptorluminofoorist ja neid ühendavast linkerist. ARC-Lum(Fluo) ühendites toimub Fösteri tüüpi resonantne energiaülekanne doonorluminofoori tripletsest olekust aktseptorluminofoori singletsele olekule. Seetõttu saaks ARC-Lum(Fluo) ühendeid potentsiaalselt kasutada OLED-ites. Selleks, et energiaülekanne toimuks võimalikult efektiivselt, peab doonor- ja aktseptorluminofoori vaheline kaugus olema väike. ARC-Lum(Fluo) ühendites toimub ka singlet-singlet energia ülekanne, mis konkureerib intersüsteemse üleminekuga ning valgusega ergastuse korral vähendab tripletse ergasuse teket. Seega kui soovime saada sondi, milles oleks tugev pikaelueaga luminestsents, peab doonori ja aktseptori vaheline kaugus olema piisavalt pikk, et soodustada intersüsteemset üleminekut singlet-singlet energiaülekanne asemel. Seetõttu on ARC-Lum(Fluo) ühendite disainimiseks oluline, et doonor- ja aktseptorluminofoori ühendava linkeri pikkust saaks täpselt kontrollida. [2]

Selle töö eesmärk on sünteesida jäiksid linkereid ARC-Lum(Fluo) ühendites kasutamiseks ning leida kõige lihtsam ja odavam viis sünteeside läbi viimiseks. Linkerite sünteesil vältitakse kalleid ja sünteesi skaalat piiravaid meetodeid (nt HPLC, süntees tahkel kandjal) ja püütakse leida sünteesiskeem, mida oleks võimalik kasutada ARC-Lum(Fluo)-de sünteesimiseks ka suuremas skaalal (grammid ja rohkem). Sünteesitavad linkerid on oligopropoliinid, sest oligopropoliini ahela jäikus võimaldab täpselt fikseerida doonor- ja aktseptorluminofoori vahelise kauguse. Samuti sünteesitakse kaks ARC-Lum(Fluo) ühendit ning mõõdetakse nende ergastus- ja emissioonispektrid ja luminesentsentsi kustumine.

### 3. Kirjanduse ülevaade

#### 3.1. Luminestsents

Luminestsents on mittesoojuslikul teel saadud energia kiirgumine aineist valgusena. Fotoluminestsentsiks nimetatakse luminestsentsi alaliiki, mille puhul aine saab luminestseerumiseks vajaliku energia footonite neeldumisest. Fotoluminestsentsi alaliigid on fluorestsents ja fosforestsents. Fluorestsentsi korral toimub kiirgumine elektroni relakseerumisel singletsest olekust. Fosforestsentsi korral toimub aga tripletsest olekust relakseerumine, mis on kvantmehaanika reeglite järgi keelatud. Seetõttu on fosforestsents tavaliselt pikema elueaga kui fluorestsents: fluorestsentsi eluiga jääb tavaliselt suurusjärku  $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  s, fosforestsentsi eluiga jääb aga tavaliselt vahemikku  $10^{-6}$  –  $10^0$  s. Toatemperatuuril lahustes esineb fosforestsentsi harva, sest sellistes tingimustes saavad molekulid relakseeruda mittekiirguslikel viisidel, näiteks soojuslikult; samuti kustutab luminestsentskiirgust hapnik. [7,8]

#### 3.2. Fotoluminestseeruvate ainete omadused

Luminestseeruvaid aineid iseloomustatakse eelkõige nende ergastus- ja emissioonispektrite põhjal. Emissioonispektrite maksimumid on tavaliselt suurematel lainepikkustel kui ergastusspektrid, seda nähtust nimetatakse Stokesi nihkeks. Lisaks saab fotoluminestseeruvaid aineid iseloomustada veel kahe tähtsa omaduse põhjal: fotoluminestsentsi kvantsaagis (PLQY) ehk kiirgunud ja neeldunud footonite arvu suhe ning luminestsentsi eluiga ( $\tau$ ). Luminestsentsi eluiga iseloomustab seda, kui kaua on molekulid keskmiselt ergastatud olekus, eluea arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (\text{Võrrand 1})$$

$$\tau = \frac{1}{k}, \quad (\text{Võrrand 2})$$

kus  $I_0$  on emissiooni algne intensiivsus,  $I$  on intensiivsus ajahetkel  $t$  ja  $k$  on eluea pöördväärtus ehk kustumise protsessi kirjeldav kiiruskonstant. [7]

##### 3.2.1. Försteri tüüpi resonantne energiaülekanne

Försteri tüüpi resonantseks energiaülekanneks (FRET) nimetatakse mingi süsteemi kahe luminestseeruva osa vahel toimuvat mittekiirguslikku energiaülekanne läbi dipool-dipoolvastasmõju, mille efektiivsus sõltub tugevalt energia doonori ja aktseptori vahelisest kaugusest. FRET-i esinemiseks peavad doonori emissioonispekter ja aktseptori ergastusspekter kattuma. Samuti on FRET-i esinemiseks vajalik, et doonori ja aktseptori

vaheline kaugus jääks vahemikku 1 kuni 10 nm. FRET-i efektiivsuse mõõtmist kasutatakse sageli kromfooridevahelise kauguse arvutamiseks: FRET-i efektiivsus on pöördvõrdeline kromfooridevahelise kauguse kuuenda astmega:

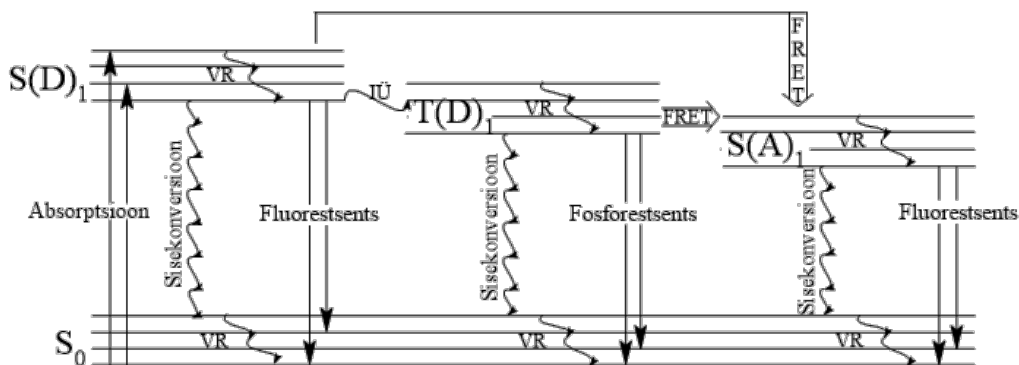
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (\text{Võrrand 3})$$

E on energiaülekanne efektiivsus,  $R_0$  on Försteri distants ja  $r$  on kromfooridevaheline kaugus. [7]

FRET-i efektiivsust arvutatakse eksperimendi andmetest tavaliselt järgmise valemiga:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (\text{Võrrand 4})$$

kus E on energiaülekanne efektiivsus,  $\tau_{DA}$  on doonor-aktseptorpaari eluiga ja  $\tau_D$  on doonori eluiga kui aktseptorit ei ole. [9]



Joonis 1: Jablonski diagramm näitab, kuidas kahte luminofoori sisaldavas süsteemis võib toimuda relakseerumised ja energiaülekanne protsessid.  $S_0$  tähistab süsteemi singletset põhiolekut,  $S(D)_1$  doonorluminofoori singletset ergastatud olekut,  $T(D)_1$  doonorluminofoori tripletset ergastatud olekut ja  $S(A)_1$  aktseptorluminofoori singletset ergastatud olekut; IÜ on intersüsteemne üleminek ja VR on vibratsiooniline relakseerumine.

### 3.2.2. Fotoluminestsentsi mõõtmine

Eelnevalt nimetatud omaduste määramiseks on vaja fotoluminestsentsi mõõta. Eristatakse kaht tüüpi mõõtmisi: pidevad ja aegviivitusega. Pideva mõõtmise korral toimub aine pidev valgusega ergastamine ja emissioonkiirguse mõõtmine. Aegviivitusega mõõtmise korral ergastatakse ainet lühikese valgusimpulsiga ja pärast seda mõõdetakse emissioonsignaali kustumist. Kuigi aegviivitusega mõõtmine nõuab keerulisemaid ja kallimaid instrumente kui pidev mõõtmine, on aegviivitusega mõõtmisel mitmeid eeliseid. [7] Aegviivitusega mõõtmisel ei detekteerita otse kiirusallikast tulevat signaali ega fluorestsentsi, mistõttu on võimalik selektiivselt mõõta fosforestsentsisignaali. [10]



### 3.3. Tiofeeni ja selenofeeni sisaldavad molekulid

ARC-ideks nimetatakse molekule, mis koosnevad adenosiini analoogist ja arginiine sisaldavast peptiidist [3]. Hiljem on see mõiste laienenud kõigile Asko Uri tööruhmas sünteesitud ühenditele [2,4,11]. Adenosiini analoog võib sisaldada fosforestseeruvat tiofeeni- või selenofeenijääki. ARC-Lum(Fluo) ühendites on ARC-iga ühendatud ka fluorofoor [2,11]. Sellistes molekulides toimub Försteri tüüpi resonantne energiaülekanne. Nimelt toimib tiofeen või selenofeen doonorina ja selle singletse ja tripletse oleku energia kandub üle fluorofoori (aktseptori) singletsele olekule (Joonis 1). [4,12]

ARC-Lum(Fluo) ühendeid on uuritud, et teha kindlaks nende sobivust OLED-ites (ingl *organic light emitting diode*) kasutamiseks. Jögela [2] leidis, et ARC-Lum(Fluo) ühendite luminesentssignaali eluiga ja FRET-i efektiivsust on võimalik reguleerida, muutes FRET-i doonori ja aktseptori vahelist kaugust. Kõige efektiivsemad ja kõige lühema luminesentsi elueaga olid need molekulid, milles oli doonori ja aktseptori vaheline kaugus väike. Energiaülekanne on kõige efektiivsem, kui doonor ja aktseptor on otse ühendatud, kuid sel juhul ei pruugi energiaülekanne olla Försteri tüüpi (FRET esineb siis, kui doonori ja aktseptori vaheline kaugus on 1 kuni 10 nm) ning võib toimuda Dexter tüüpi energia ülekanne. Samuti on leitud, et väga efektiivse FRET korral ARC-Lum(Fluo) ühendite luminesentsi eluiga ei sõltunud oluliselt temperatuurist vahemikus 25 °C kuni 75 °C, mis eristab neid teistest aeglase luminesentsiga ainetest.[2]

Kuna ARC-Lum(Fluo)-des kasutatakse tavaliselt kas tiofeeni või selenofeeni, on oluline teada, millist mõju see molekuli omadustele avaldab. On leitud, et seleeni sisaldavad ARC-id on lühema luminesentsi elueaga: seleeni sisaldavate luminofooride fosforestsentsi eluead jäävad vahemikku 19 – 42 µs, väävlit sisaldavate luminofooride fosforestsentsi eluead jäävad aga vahemikku 109 – 266 µs [1]. Cho *et al.* [13] võrdlesid selenofeeni ja tiofeeni sisaldavate komplekside optilisi omadusi. Nad leidsid, et selenofeeni sisaldav kompleks kiirgas suurema lainepikkusega punast valgust kui tiofeeni sisaldav kompleks seleeni suurema polariseeritavuse tõttu. Tumepunase värvuse saavutamine on oluline, sest punaseid OLED-e saaks kasutada komponendina OLED-ekraanides. [13]

Chen *et al.* [14] uurisid erinevate tiofeeni sisaldavate molekulide optilisi omadusi lahustes ja tahketes kildes. Leiti, et molekulide emissioon tahkes kildes on suurem kui lahuses, sest molekulide võimalused anda energiat ära mittekiiruslikel viisidel (nt pöörlemisel, paindumisel, vibratsioonil) on piiratud. Samuti leiti, et molekulide emissiooniomadused sõltuvad nende jäikusest. On teada, et ka ARC-ide fotoluminesentsi intensiivsus sõltub

ümbritseva keskkonna jäikusest ja hapniku juurdepääsetvusest. [2]. Seetõttu tehakse ARC-ide omaduste mõõtmisi polüvinüülalkoholi- ehk PVA-maatriksis.

### 3.4. Oligoproliniiahelad

Oligo- ja polüproliinid moodustavad sekundaarse struktuurina kahte tüüpi heelikseid: PPI heeliks ja PPII heeliks. Need heeliksid on erinevad tavalistest valkudes esinevatest alfa-heeliksitest. PPI heeliks on paremakäeline ja selles heeliksis on peptiidsidemed *cis*-konformatsioonis. PPI heeliks on PPII heeliksiga võrreldes oluliselt kompaktsem. PPII heeliks on paremakäeline ja peptiidsidemed on *trans*-konformatsioonis. Kuna *trans*-konformatsioon on madalama energiaga kui *cis*-konformatsioon, on PPII heeliks PPI heeliksist levinum. PPII heeliksit esineb ka valkudes, mis sisaldavad peale proliini teisigi aminohappeid. PPII heeliksis lisab üks proliinijääk ahela pikkusele u 3 Å. PPII heeliksis oligoproliniiahelat peetakse suhteliselt jäigaks struktuuriks ja seda on võimalik kasutada molekulaarse joonlauana. Oligoproliniiahela kasutamine linkerina ARC-ides võimaldab fikseerida distantsi doonor- ja aktseptorluminofoori vahel. [15] Paindliku linkeri korral saaksime erinevate konformatsioonide ja selle tõttu ka erinevate doonori ja aktseptori vaheliste distantside segu.

### 3.5. ARC-Lum(Fluo)-de rakendused

Adenosiini analoogist ja arginiine sisaldavast peptiidist koosnevaid ARC-e kasutatakse bisubstraatsete sondidena proteiinkinaaside uurimiseks [16–19]. Hiljem on hakatud sarnase struktuuriga molekule uurima muude rakenduste, sh OLED-ite jaoks. ARC-ide uurimine OLED-ites kasutamiseks on huvipakkuv, kuna ARC-ides saavutatakse toatemperatuuril pika elueaga signaal, kasutamata raskemetalle, mistõttu on ARC-ide süntees odavam ja need on vähem toksilised [8].

Orgaanilisi luminesceeruvaid molekule kasutatakse OLED-ites. Võrreldes mitteorgaaniliste LED-idega, peetakse OLED-ekraanide eelisteks kiiremat reageerimisaega, realistlikumaid värve, energiasäästlikkust ning võimalust valmistada läbipaistvaid, painduvaid ja kumeraid ekraane. OLED-id tehnoloogia katsumusteks on aga ekraani sissepõlemise vältimine, eluea pikendamine ja piisava valgustugevuse saavutamine. [5,6]

Potentsiaalselt saaks ARC-Lum sonde kasutada ka hapniku sensoritena, sest nende luminesentsi intensiivsus ja eluiga sõltub hapniku kontsentratsioonist keskkonnas [11]. Selle töö eesmärk on sünteesida linkereid ARC-Lum(Fluo) ühendites kasutamiseks ning leida kõige lihtsam ja odavam viis sünteeside läbi viimiseks. Linkerite sünteesil välditakse kalleid

ja sünteesi skaalat piiravaid meetodeid (nt HPLC, süntees tahkel kandjal) ja püütakse leida sünteesiskeem, mida oleks võimalik kasutada ARC-Lum(Fluo)-de sünteesimiseks ka tööstuslikul skaalal (kuni tonnides). Sünteesitavad linkerid on oligoproliidid, sest oligoproliid ahela jäikus võimaldab täpselt fikseerida doonor- ja aktseptorluminofoori vahelise kauguse. Samuti sünteesitakse kaks ARC-Lum(Fluo) ühendit ning mõõdetakse nende ergastus- ja emissioonispektrid ja luminesentsi kustumine.

#### 4. Reagentide, aparatuuri ja meetodite kirjeldus

Kasutati kõrgkvaliteetseid reagente puhtusega üle 99% firmadelt Sigma-Aldrich, Iris Biotech GmbH, Fluka, Alfa Aesar. 5-TAMRA-SE saadi firmalt Primetech.

Õhukese kihi kromatograafia tegemiseks kasutati Polygram (R) Sil G UV254 silikageeelig kaetud UV fluorofooriga plaate (Macherey – Nagel), visualiseeriti 254 nm UV kiirgusega ja/või ilmutati  $\text{KMnO}_4$  või 4-dimetüülaminoasobenseeni lahusega, kui eksperimendi kirjelduses ei ole märgitud teisti.

Lahustite eemaldamiseks pärast sünteesi kasutati firma Büchi vaakumrotaatorit Rotavapor (R) R-200 ja firma Christ lüofilisaatorit.

$^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  tuumamagnetresonantsspektroskoopia tehti Bruker Avance-III 700 MHz ja Bruker Avance-II 200 MHz TMR spektromeetritel, vesiniku resonantssagedus oli 200 või 700 MHz ja süsinikul 50 või 175 MHz. Solvendina kasutati  $\text{CDCl}_3$  või DMSO-d. Keemilise nihke standard oli solvendi  $\text{CDCl}_3$  või TMS signaal.

Sünteeside produkte analüüsiti vedelikkromatograafia-massispektromeetria abil Shimadzu Prominence HPLC vedelikkromatograafia. Kasutati C18-pöördfaas-kolooni (Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$ ), gradientelueeriti atsetonitriili ja vee seguga (0,1% TFA). Massispektrid mõõdeti Shimadzu LCMS-2020 massispektromeetriga.

Sünteesitud ARC-ide kontsentratsiooni lahuses hinnati NanoDrop 2000c UV-Vis spektrofotomeetriga. Lahuse neelduvuse põhjal 5-TAMRA neeldumismaksimumis (u 580 nm) arvutati lahuse kontsentratsioon, kasutades Lambert-Beer'i seadust  $A = \epsilon cl$ . 5-TAMRA neeldumiskoeffitsiendiks  $\epsilon$  võeti  $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . [13]

Ergastus- ja emissioonispektrid mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga Synergy Neo. Ergastusspektreid mõõdeti lainepikkuste vahemikus 250 – 430 nm sammuga 1 nm, oodatavaks emissiooni lainepikkuseks määrati 580 nm. Aegviivituseks määrati 100  $\mu\text{s}$  ja integratsiooniajaks 2000  $\mu\text{s}$ . Emissioonispektreid mõõdeti lainepikkuste vahemikus 400 – 800 nm sammuga 1 nm, ergastuse lainepikkuseks määrati 340 nm. Aegviivituseks määrati 100  $\mu\text{s}$  ja integratsiooniajaks 2000  $\mu\text{s}$ . Eri süvenditest mõõdetud väärtused keskmistati, suurim väärtus võrdustati 100-ga.

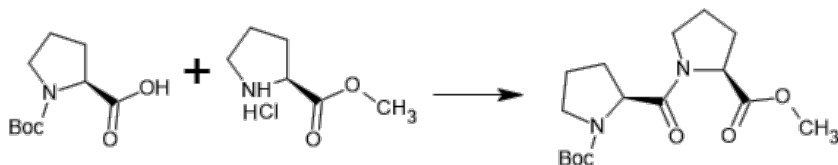
Luminesentssignaali kustumist mõõdeti spektrofluoromeetriga Fluoromax-4 aegviivitusega mõõtmise režiimis. Ergastati lainepikkusel 340(20) nm, emissioonisignaali koguti

lainepikkusel 590(10) nm. Sammupikkus oli 0,05 ms ja maksimaalne mõõteag oli ARC-1491 puhul 5 ms ja ARC-1492 puhul 10 ms.

## 5. Eksperimentaalne osa

### 5.1. Orgaaniline süntees

#### 5.1.1. Boc-di-L-proliinmetüülestri süntees



Joonis 2: Boc-di-L-proliinmetüülestri (**1a**) üldine sünteesiskeem

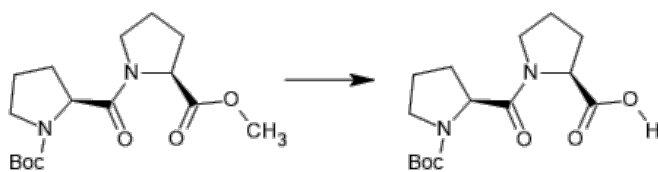
##### 5.1.1.1. Meetod 1

Sünteesiskeem Joonisel 2. 1076 mg Boc-L-proliini (5,0 mmol) ja 1894 mg HBTU (5,0 mmol) lisati 100 ml ümarkolbi ja lahustati 10 ml DMF-is. Lisati 607 µl TEA-d (4,4 mmol). 998 mg ProOMe (7,7 mmol) lahustati 15 ml DMF-is, lisati 1,3 ml TEA-d (9,3 mmol), ProOMe lahus lisati Boc-L-proliini lahusele, kolbi loputati kaks korda 2 ml DMF-iga ja üks kord 1 ml DMF-iga. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril üleöö. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti EA/heksaan 1:1,  $R_f(1a) = 0,18$ . Lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 50 ml etüülatsetaadis, pesti kaks korda 50 ml 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega, kaks korda 50 ml 10% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> lahusega ja üks kord 50 ml küllastatud NaCl lahusega. Orgaanikakiht koguti 50 ml ümarkolbi, lahusti eemaldati rotaatoraurustiga ja lüofilisaatoriga. Produkti **1a** saadi 990 mg (3,0 mmol, 61%). <sup>1</sup>H TMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,18–1,33 (t, 1H), 1,38, 1,44 (d, 9H), 1,70–2,45(m), 3,68–3,72 (3H), 4,04–4,22 (q, 1H), 4,32–4,70 (m, 2H). (Joonis 17)

##### 5.1.1.2. Meetod 2

Sünteesiskeem Joonisel 2. 1051 mg Boc-LPro (4,9 mmol) lahustati 5 ml NMM-s (45,5 mmol), lisati 762 mg HOBt lahustatuna 12 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-s. Reaktsioon jahutati – 47 °C-ni 1,3-dimetüülbenseen/N<sub>2</sub> jahutusvannil. Lisati 757 mg EDC-d, segati 15 min. Kolbi pipeteeriti tilkhaaval 982 mg Pro-Me\*HCl ja 1360 µl TEA lahus 20 ml 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-s. Jahutus eemaldati. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1,  $R_f(1a) = 0,65$ . Reaktsioon käis üleöö, lahusti aurustati i rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 50 ml etüülatsetaadis, pesti kaks korda 50 ml 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega, kaks korda 50 ml 10% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> lahusega ja üks kord 50 ml küllastatud NaCl lahusega. Orgaanikakihti kuivatati veevaba MgSO<sub>4</sub>-ga. MgSO<sub>4</sub> eemaldati, filtreerides läbi vati. Lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produkti **1a** saadi 474 mg (1,5 mmol, 30%).

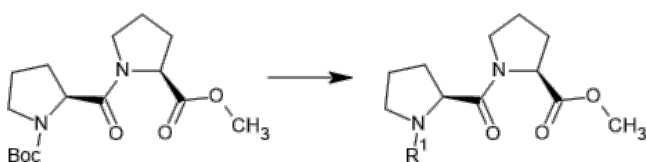
### 5.1.2. Boc-di-L-proliini süntees



Joonis 3: Boc-di-L-proliini (**1b**) üldine sünteesiskeem

Sünteesiskeem Joonisel 3. Produkt **1a** lahustati 2 ml metanoolis, umbes pool lahusest pipeteeriti 25 ml kolbi (542 mg, 1,7 mmol). Kolbi lisati veel 3,55 ml metanooli ja magnetsegaja. Kolbi jahutati vesi/jää jahutusvannis 0 °C-ni. Keeduklaasi kaaluti 133 mg LiOH·H<sub>2</sub>O (3,2 mmol), lahustati 2 ml vees (1,6 M lahus). Lahus pipeteeriti tilkhaaval kolbi, seejärel jahutusvann eemaldati. Reaktsioon käis 3 h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH 90:8:2, R<sub>f</sub>(**1b**) = 0,48. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 40 ml etüülatsetaadis, lisati 4,5 ml 10% KHSO<sub>4</sub> lahust. Veekihi pH pärast ekstraheerimist oli 1 – 2. Orgaanikakihti pesti kaks korda 40 ml küllastatud NaCl lahusega, kuivatati veevaba MgSO<sub>4</sub>-ga. MgSO<sub>4</sub> eemaldati, filtreerides läbi vati. Orgaanikakiht koguti 50 ml kolbi, lahusti aurustati rotaatoraurusti ja lüofilisaatoriga. Produkt oli kollakasvalge tahke vaht. Produkti **1b** saadi 423 mg (1,4 mmol, 82%). TMR oli sarnane kirjanduses varasemalt saadud tulemusega. [20]

### 5.1.3. Di-L-proliinmetüülester-soolade süntees



Joonis 4: Di-L-proliinmetüülester-soolade üldine sünteesiskeem. **1d**: R<sup>1</sup> = TFA; **1e**: R<sup>1</sup> = HCl; **1f**: R<sup>1</sup> = pTsOH

#### 5.1.3.1. Di-L-proliinmetüülester-TFA süntees

Sünteesiskeem Joonisel 4. 446 mg produkti **1a** (1,4 mmol) lahustati 3,7 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-s 50 ml kolvis, lisati magnetsegaja, kolb asetati jäävanni. 0 °C juures pipeteeriti kolbi 0,6 ml TFA-d. Reaktsioon käis 3,5 h, reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Lahusti aurustati rotaatoraurusti ja lüofilisaatoriga. Õlijat produkti **1d** saadi 694,93 mg (kvantitatiivne saagis).

#### 5.1.3.2. Di-L-proliinmetüülester-pTs süntees

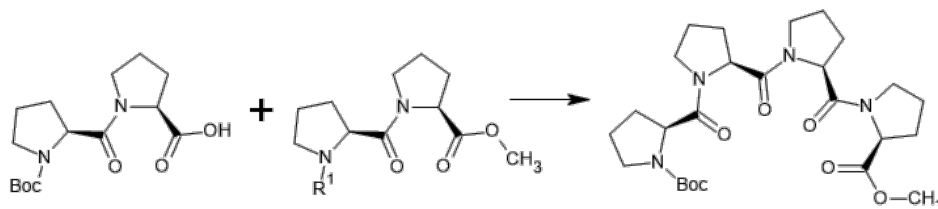
Sünteesiskeem Joonisel 4. 474 mg produkti **1a** lahustati 2 ml metanoolis, 1 ml pipeteeriti 25 ml ümarkolbi, lahusti aurustati rotaatoraurustiga, m(**1a**) = 196 mg. 207 mg p-

tolueensulfoonhapet lahustati 200 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-s, lisati 400 µl THF-i. Lahus lisati **1a**-le ja segati 30 min. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produkti **1f** saagist ei hinnatud, sest liigset p-tolueensulfoonhapet ei eemaldatud.

### 5.1.3.3. Di-L-proliinmetüülester-HCl süntees

Sünteesiskeem Joonisel 4. 5 ml ümarkolbi kaaluti 111 mg produkti **1a** (0,34 mmol), lahustati 1 ml metanoolis. Kolbi pipeteeriti 296 µl 35% HCl lahust. Reaktsioon käis 1 h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Lahusti aurustati rotaatoraurusti ja lüofilisaatoriga. Produkti **1e** saadi 82,7 mg (0,31 mmol, 93%). <sup>1</sup>H TMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,80–2,70, 3,12–3,67, 3,73, 7,50–8,12, 10,85–11,70. (Joonis 19)

### 5.1.4. Boc-tetra-L-proliinmetüülestri süntees



Joonis 5: Boc-tetra-L-proliinmetüülestri (**2a**) üldine sünteesiskeem

#### 5.1.4.1. Meetod 1

Sünteesiskeem Joonisel 5. 25,2 mg produkti **1b** (0,08 mmol) lahustati 265 µl DMF-is, lisati 34 µl TEA-d ja 33,5 mg HBTU-d. Lahust inkubeeriti 1,5 h. Ümarkolbi kaaluti 82,0 mg **1f**, lisati 2 ml MTBE-d ja 2 ml 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahust. Eetrikiht koguti eraldi kolbi. Vee kihti ekstraheeriti veel kaks korda 1 ml MTBE-ga, eetrikihid lisati kolbi. Lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produkti **1c** saadi 39,8 mg (0,18 mmol). **1c** kolbi pipeteeriti **1b** lahus. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1, R<sub>f</sub>(**2a**) = 0,74. Reaktsioonisegu segati üleöö. Lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 20 ml etüülatsetaadis, pesti kaks korda 20 ml 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega, kaks korda 20 ml 10% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> lahusega ja üks kord 20 ml küllastatud NaCl lahusega. Orgaanikakihti kuivatati veevaba MgSO<sub>4</sub>-ga. MgSO<sub>4</sub> eemaldati, filtreerides läbi vati. Lahusti aurustati rotaatoraurustiga. Produkti **2a** saadi 5,38 mg (0,01 mmol, 13%). TMR oli sarnane kirjanduses varasemalt saadud tulemusega. [20] (Joonis 18)

#### 5.1.4.2. Meetod 2

Sünteesiskeem Joonisel 5. 1,5 ml Eppendorfi tuubi kaaluti 9,73 mg produkti **1b** ja lahustati 100 µl DMF-is. Lisati 13 µl TEA-d ja 13,1 mg HBTU-d, segati. 10 min pärast lisati 10,4 mg



**1e.** Reaktsioon käis toatemperatuuril üleöö, reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Lahusti kuivatati lüofilisaatoriga. Ekstraheerimiseks lahustati produkt 600 µl etüülatsetaadis, pesti kolm korda 600 µl 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega ja üks kord 600 µl küllastatud NaCl lahusega.

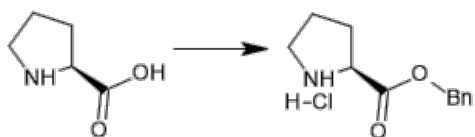
#### 5.1.4.3. Meetod 3

Sünteesiskeem Joonisel 5. 1,5 ml Eppendorfi tuubi kaaluti 9,34 mg produkti **1b** ja lahustati 100 µl DMF-is. Lisati 13 µl TEA-d ja jahutati jäävannis. Lisati 5,63 mg EDC-d, saegati. 10 min pärast lisati 9,38 mg **1e**. Reaktsioon käis toatemperatuuril üleöö, reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Lahusti kuivatati lüofilisaatoriga. Ekstraheerimiseks lahustati produkt 600 µl etüülatsetaadis, pesti kolm korda 600 µl 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega ja üks kord 600 µl küllastatud NaCl lahusega.

#### 5.1.4.4. Meetod 4

Sünteesiskeem Joonisel 5. 1,5 ml ependorfi kaaluti 9,49 mg produkti **1b** ja lahustati 100 µl DMF-is. Lisati 13 µl TEA-d ja 17,6 mg PyAOP-d, segati. 10 min pärast lisati 9,51 mg **1e**. Reaktsioon käis toatemperatuuril üleöö, reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga. Lahusti kuivatati lüofilisaatoriga. Ekstraheerimiseks lahustati produkt 600 µl etüülatsetaadis, pesti kolm korda 600 µl 5% NaHCO<sub>3</sub> lahusega ja üks kord 600 µl küllastatud NaCl lahusega.

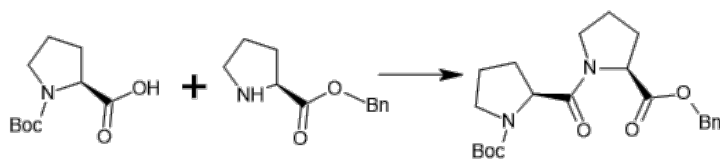
#### 5.1.5. L-proliinbensüülestri süntees



Joonis 6: L-proliinbensüülestri (**0a**) üldine sünteesiskeem

Sünteesiskeem Joonisel 6. 995 mg L-proliini (8,6 mmol) kaaluti 50 ml ümarkolbi ja lahustati 10 ml bensüülalkoholis. Kolbi jahutati vesi/jää jahutusvannis. 0 °C juures lisati 1104 µl tionüülkloriidi ja segati 2,5 h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1, R<sub>f</sub>(**0a**) = 0,63. Jahutusvann eemaldati ja reaktsioonisegu kuumutati 95 °C juures 19 h. Seejärel kuumutus eemaldati ja reaktsioonisegu segati toatemperatuuril veel 50 h. Kolbi lisati etüülatsetaati kuni sademe tekkimiseni. Sade filtreeriti paberfiltriga ja kuivatati toatemperatuuril üleöö. Produkti **0a** saadi 1675 mg (94%).

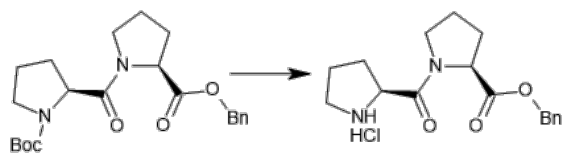
### 5.1.6. Boc-di-L-proliinbensüülestri süntees



Joonis 7: Boc-di-L-proliinbensüülestri (**1a\***) üldine sünteesiskeem

Sünteesiskeem Joonisel 7. 508 mg **0a** toorprodukti lahustati 20 ml CHCl<sub>3</sub>-s ja ekstraheeriti kaks korda 20 ml 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahusega. Orgaanikakiht koguti kolbi ja roteeriti. Puhast L-Pro-Bn-i saadi 395 mg (1,9 mmol), see lahustati 5 ml DMF-is ja lisati 325 µl TEA-d. 501 mg Boc-L-Pro-OH (2,3 mmol) ja 968 mg HBTU-d (2,6 mmol) lahustati 5 ml DMF-is, lisati 325 µl TEA-d, inkubeeriti 50 min. Boc-L-Pro-OH lahus lisati **0a** lahusele. Segati toatemperatuuril 120 h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1, R<sub>f</sub>(**1a\***) = 0,82. Lahusti kuivatati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 30 ml EA-s, ekstraheeriti kaks korda 30 ml 5% NaHCO<sub>3</sub>, kaks korda 30 ml 10% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ja üks kord 30 ml küll. NaCl lahusega. Orgaanikakihti kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga, roteeriti. Õlijat produkti **1a\*** saadi 855 mg (kvantitatiivne saagis).

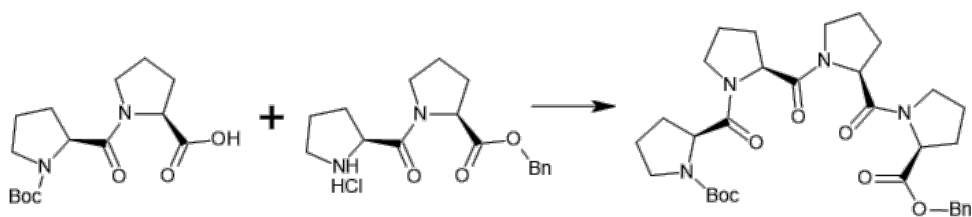
### 5.1.7. Di-L-proliinbensüülester-HCl süntees



Joonis 8: Di-L-proliinbensüülester-HCl (**1e\***) üldine sünteesiskeem

Sünteesiskeem Joonisel 8. 855 mg **1a\*** (2,1 mmol) lahustati 8 ml MeOH-s, lisati 2286 µl 35% HCl lahust. Segati 1 h, roteeriti, kuivatati lüofilisaatoriga. Produkt lahustati 40 ml EA-s, lisati 3 ml 10 % KHSO<sub>4</sub> lahust, kuni pH oli 1...2. Ekstraheeriti 40 ml küll. NaCl lahusega. Orgaanikakihti kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga, roteeriti. Produkti **1e\*** saadi 867 mg (2,3 mmol, kvantitatiivne saagis).

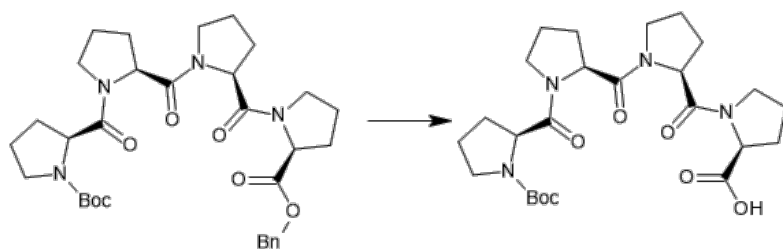
### 5.1.8. Boc-tetra-L-proliinbensüülestri süntees



Joonis 9: Boc-tetra-L-proliinbensüülestri (**2a\***) üldine sünteesiskeem

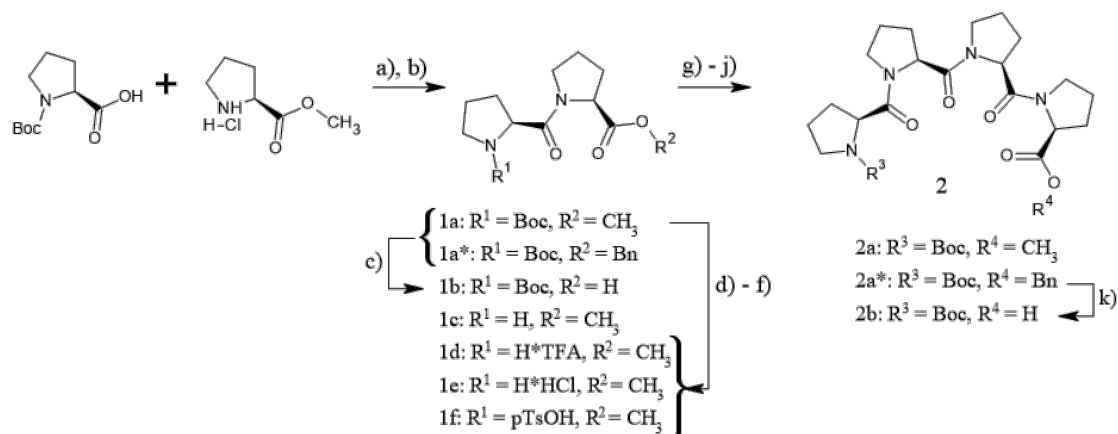
Sünteesiskeem Joonisel 9. 200 mg **1b** (0,64 mmol) lahustati 2 ml DMF-is, lisati 267 mg HBTU-d ja 135 µl TEA-d. Lahust inkubeeriti 15 min. 238 mg **1e\*** (0,62 mmol) lahustati 1,5 ml DMF-is, lisati 300 µl TEA-d. **1e\*** lahust lisati **1b** lahusele. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril 72 h. Reaktsiooni kulgu kontrolliti TLC-ga, vooluti CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1, R<sub>f</sub>(**2a\***) = 0, 79. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 10 ml EA-s, ekstraheeriti kaks korda 10 ml 1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, kaks korda 10 ml 10 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ja üks kord küllastatud NaCl lahustega. Produkti **2a\*** saadi 135 mg (0,23 mmol, 36%). (Joonis 20)

### 5.1.9. Boc-tetra-L-proliini süntees



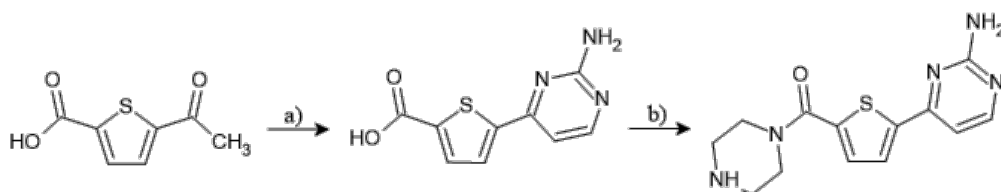
Joonis 10: Boc-di-L-proliini (**1b**) üldine sünteesiskeem

Sünteesiskeem Joonisel 10. 121 mg **2a\*** (0,20 mmol) lahustati 1 ml MeOH-s, jahutati jäävannil. 0,25 ml 1,6 M LiOH lahust lisati tilkhaaval **2a\*** lahusele. Jäävann eemaldati. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril 2 h. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati 8 ml EA-s, lisati 400 µl 1 M KHSO<sub>4</sub> lahust ja 8 ml küllastatud NaCl lahust. pH u 1...2. EA kiht eraldati. Veekihti ekstraheeriti veel kaks korda 8 ml EA-ga. EA-kihid ühendati, kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga, rotaatoraurustiga. Produkti **2b** saadi 90,4 mg (0,18 mmol, 88%).



Joonis 11: Linkerite sünteesiskeemid. a) HBTU, TEA, DMF, 24 °C, 18 h, 61–76%; b) HOBt, EDC, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF, -48 °...24 °C, 18h, 30%; c) LiOH·H<sub>2</sub>O, MeOH/H<sub>2</sub>O, 0 °...24 °C, 3 h, 82%; d) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24 °C, 3,5 h; e) HCl, MeOH, H<sub>2</sub>O, 24 °C, 1h, 93%; f) pTsOH, THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24 °C, 0,5 h; g) 1b, 1c, HBTU, TEA, DMF, 24 °C, 18 h, 13%; h) 1b, 1e, HBTU, TEA, DMF, 24 °C, 18 h; i) 1b, 1e, EDC, TEA, DMF, 24 °C, 18 h; j) 1b, 1e, PyAOP, TEA, DMF, 24 °C, 18h; k) 2a\*, LiOH·H<sub>2</sub>O, 0 °...24 °C, 2 h, 88%.

### 5.1.10. 5-(2-amino-4-pürimidinüül)-2-tiofeenkarboksüülhappe süntees



Joonis 12: 5-(2-amino-4-pürimidinüül)-2-tiofeenkarboksüülhappe piperasiinamiidi sünteesiskeem. a) 1) 5-atsetüültiofeen-2-karboksüülhappe, DMF-DMA, DMF, 130 °C, 22 h; 2) guanidiin HCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 130 – 145 °C, 72 h; 3) 0,5 M KOH, 115 °C, 18 h, 77%; b) 3, NMM, HBTU, DMF, piperasiin, 1h, 100%.

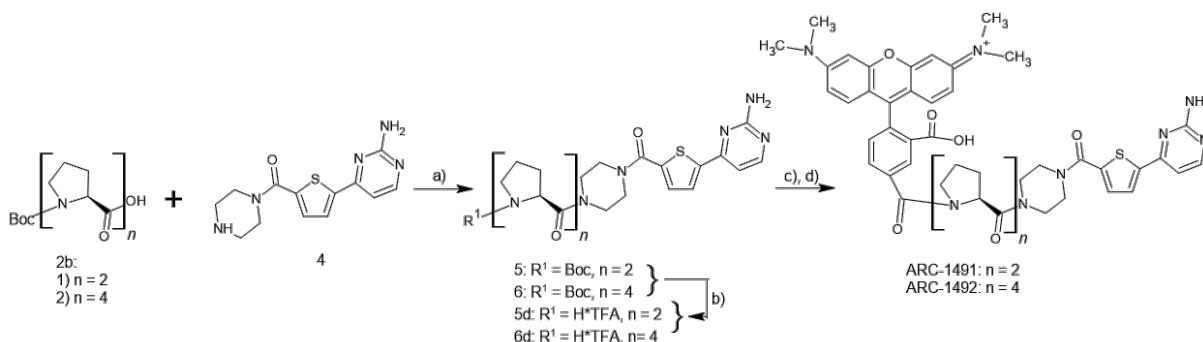
Aine 3 süntees viidi läbi varasemalt kirjeldatud eeskirja põhjal [1]. Sünteesiskeem on

Joonisel 12. 1002 mg (5,9 mmol) 5-atsetüültiofeen-2-karboksüülhapet kaaluti 25 ml ümarkolbi, lahustati 5 ml DMF-is, (lisati magnetsegaja,). Kolbi pipeteeriti 2 ml DMF-DMA-d. Kuumutati 130 °C plaadi kohal 22 h (üleöö). Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Vaheprodukt lahustati 25 ml DMF-is ja lisati 100 ml ümarkolbi, kuhu oli kaalutud 1429 mg guanidiin hüdrokloriidi ja 3037 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Reaktsioonisegu segati 130 °C plaadi kohal 24 h. Reaktsioonisegust tehti TLC, mis näitas, et lähteainet 1 oli alles. Reaktsioonisegusse lisati veel 192 mg guanidiin hüdrokloriidi ja 413 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ning segati veel 48 h 145 °C plaadil. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Kolbi lisati 60 ml 0,5 M KOH lahust. Kuumutati 115 °C plaadil üleöö. Reaktsioonisegu jahutati, lahuse ruumala vähendati rotaatoraurustiga. Lahus kanti 50 ml tuubi. Lahus hapustati KHSO<sub>4</sub>-ga, tekkis sade. Sade tsentrifuugiti tuubi põhja, lahus eemaldati. Sadet pesti kaks korda veega. Sade kuivatati lüofilisaatoris. Produkti 3 saadi 1,00 g (77%). TMR oli sarnane kirjanduses varasemalt saadud tulemusega. [1]

### 5.1.11. 5-(2-amino-4-pürimidinüül)-2-tiofeenkarboksüülhappe piperasiinamiidi süntees

Sünteesiskeem Joonisel 12. 21,0 mg ainet 3 (0,095 mmol) lahustati 2 ml DMF-is, lisati 104 µl NMM-i ja 36,9 mg HBTU-d. Lahust inkubeeriti 3 min, seejärel lisati 47,6 mg piperasiini. Reaktsioonisegu segati 1 h, lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Lahustati 5 ml 0,4 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lahuses ja 5 ml EA-s. EA-kiht eraldati. Vee kihti ekstraheeriti veel neli korda 3 ml EA-ga. EA-kihid ühendati, kuivatati MgSO<sub>4</sub>, lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Ainet 4 saadi 29,5 mg (0,10 mmol, kvantitatiivne saagis). (Joonis 21)

### 5.1.12. Ainete 5 ja 6 süntees



Joonis 13: ARC-ide sünteesiskeem. a) 2b, 4, HBTU, NMM, DMF, 18 h, 27%; b) 5/6, TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0...22 °C, 1,5 h; c) 5d, 5-TAMRA-SE, NMM, DMF, 42 h, 21%; d) 5d, 5-TAMRA-SE, HBTU, NMM, 18 h, 30%.

Joonis 13: reaktsioon a. 18,0 mg produkti **2b** kaaluti 5 ml ümarkolbi. 14,5 mg HBTU-d lahustati 500 µl DMF-is, pipeteeriti kolbi, lisati 39,6 µl NMM-i. Lahust inkubeeriti 10 min. 12,2 mg produkti **4** lahustati 250 µl DMF-is ja lisati kolbi. Reaktsioonisegu segati toatemperatuuril üleöö. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produkt lahustati ml EA-s, ekstraheeriti kaks korda 1,5 ml 1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ga, kaks korda 1,5 ml 10 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ga ja üks kord 2 ml küllastatud NaCl lahusega. Kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga, lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produktide **5** ja **6** segu saadi 7,47 mg (0,01 mmol, 27%). Puhastati kolonnkromatograafiaga (eluent 84:15:0,8 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/TEA, R<sub>f</sub>(**5**) = 0,82, R<sub>f</sub>(**6**) = 0,79). Pärast puhastamist oli produktide segu m = 2,8 mg.

### 5.1.13. Ainete 5d ja 6d

Joonis 13: reaktsioon b. 2,8 mg produktide **5** ja **6** segu lahustati CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-s jahutati jäävannil. Lisati 100 µl TFA-d, jäävann eemaldati. Reaktsioonisegu segati 1,5 h. Lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produktid puhastati HPLC-ga. Produkti **5d** saadi 300 nmol, produkti **6d** saadi 150 nmol.

#### 5.1.14. ARC-1491 süntees

Joonis 13: reaktsioon c. 100 nmol 5-TAMRA-SE-d lahustati 50 µl DMF-is, lisati 5 µl NMM-i, segati. Lahus lisati 100 nmol **5d**-le. Reaktsioonisegu hoiti toatemperatuuril üleöö. Lisati 200 nmol HBTU-d ja hoiti veel u 18 h. ARC-1491 puhastati HPLC-ga, saadi 21 nmol (21%).

#### 5.1.15. ARC-1492 süntees

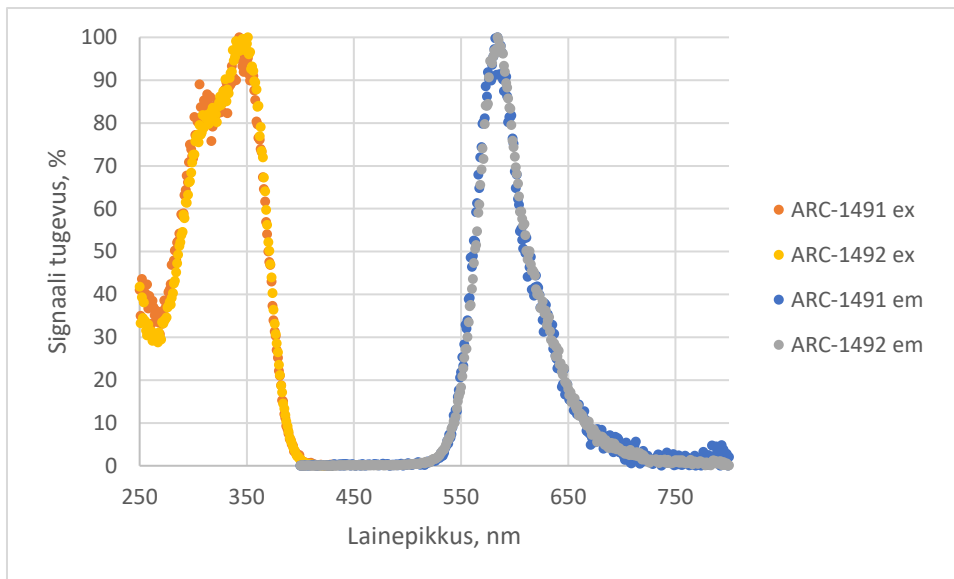
Joonis 13: reaktsioon d. 50 nmol 5TAMRA-SE-d lahustati 10 µl DMF-is, lisati 3 µl NMM-i ja 50 nmol HBTU-d. Segati 3 min. Lahus lisati 50 nmol **6d**-le. Reaktsioonisegu hoiti toatemperatuuril üleöö. ARC-1492 puhastati HPLC-ga, saadi 15 nmol (30%).

### 5.2. Sünteesitud ühendite iseloomustamine

#### 5.2.1. Ergastus- ja emissioonispektrite mõõtmine

Sünteesitud ARC-ist valmistati 0,5 mM ja 0,05 mM lahused PVA-s. Kolme mikrotiiterplaadi süvendisse pipeteriti 20 µl 0,5 mM lahust ja kahte auku 20 µl 0,05 mM lahust. Lahusel lasti kuivada kaks päeva. Ergastus- ja emissioonispektrid mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga Synergy Neo. Ergastusspektreid mõõdeti lainepikkuste vahemikus 250 – 430 nm sammuga 1 nm, oodatavaks emissiooni lainepikkuseks määrati 580 nm. Aegviivituseks määrati 100 µs ja integratsiooniajaks 2000 µs. Emissioonispektreid mõõdeti lainepikkuste vahemikus 400 – 800 nm sammuga 1 nm, ergastuse lainepikkuseks määrati 340 nm. Aegviivituseks määrati 100 µs ja integratsiooniajaks 2000 µs. Eri süvenditest mõõdetud väärtused keskmistati, suurim väärtus võrdustati 100-ga.

Joonisel 14 on näha, et mõlema ARC-i ergastusspektri maksimum on u 340 nm juures, mis langeb kokku kasutatud doonorluminofoori jaoks eelnevates uurimustes mõõdetud tulemustega.<sup>2</sup> Mõlema ARC-i emissioonispektri maksimum on u 585 nm, mis vastab 5-TAMRA emissioonispektri maksimumile.



Joonis 14: ARC-1491 ja ARC-1492 aegviivitusega ergastus(ex)- ja emissioonispektrid(em).

### 5.2.2. Luminesentssignaali kustumise mõõtmine

Sünteesitud ARC-ist valmistati 0,5 mM lahused PVA-s. 20 µl lahust kanti klaasplaadile ja lasti kuivada kaks päeva. Luminesentssignaali kustumist mõõdeti spektrofluoromeetriga Fluoromax-4. Ergastati lainepikkusel 340(20) nm, emissioonisignaali koguti lainepikkusel 590(10) nm. Sammupikkus oli 0,05 ms ja maksimaalne mõõteaeg oli ARC-1491 puhul 5 ms ja ARC-1492 puhul 10 ms.

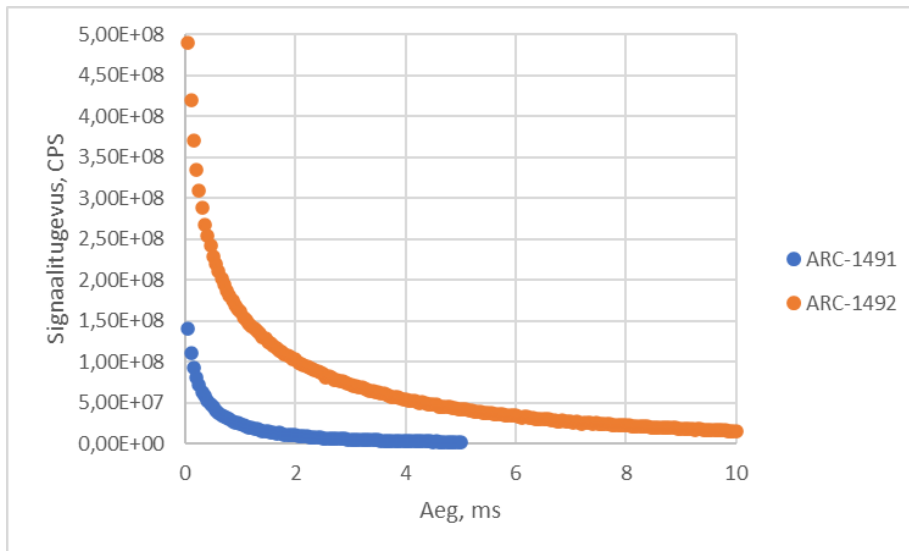
Võrrandist 1 järeldub, et luminesentssignaali intensiivsus väheneb ajas eksponentsiaalselt. Varasemalt on leitud, et kõikide ARC-Lum(Fluo) ühendite kustumine ei allu üheeksponentsiaalsele mudelile, vaid sisaldab kiiret ja aeglast komponenti [2]. Seetõttu analüüsiti luminesentssignaali kustumist ühe- ja kaheeksponentsiaalse kustumiskõveraga. Andmetöötluseks kasutati programmi GraphPad Prism. Algintensiivsust ega platoo väärtust ei fikseeritud. Mõlema mudeli põhjal arvutati luminesentssignaali eluiga. Kaheeksponentsiaalse mudeli korral arvutati keskmistatud luminesentssignaali eluiga järgmise valemi põhjal:

$$\bar{\tau}_l = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (\text{Võrrand 5})$$

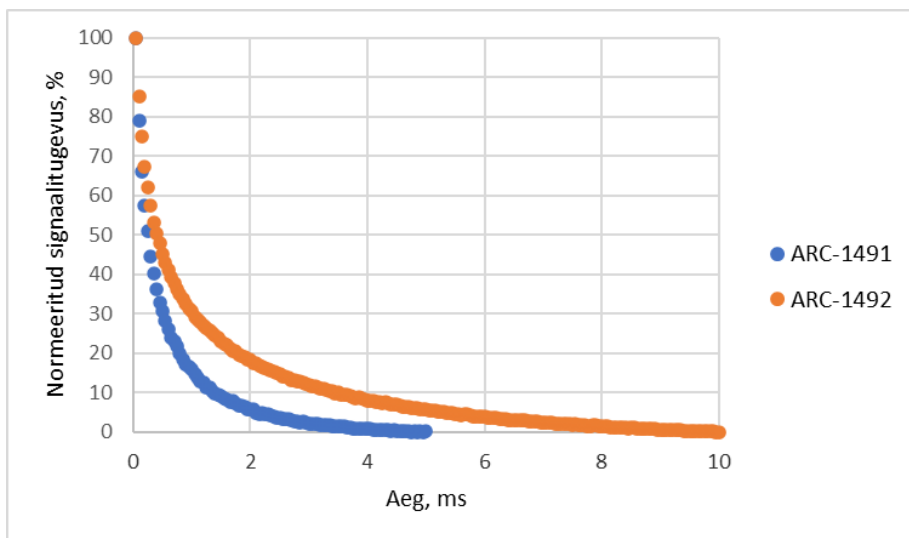
$\bar{\tau}_l$  tähistab keskmistatud luminesentsi eluiga,  $\alpha_i$  vastava komponendi (kiire või aeglase) osakaalu ning  $\tau_i$  selle komponendi eluiga. [7]

Joonisel 15 on kujutatud ARC-ide luminesentssignaali kustumine. Üheeksponentsiaalse mudeli järgi saadi ARC-1491 luminesentssignaali elueaks 0,46 ms ja ARC-1492 elueaks 1,2 ms. Kaheeksponentsiaalse mudeli järgi saadi ARC-1491 kiire komponendi (61%) elueaks

0,15 ms ja aeglase komponendi (39%) elueaks 0,90 ms. ARC-1492 kiire komponendi (60%) elueaks saadi 0,24 ms ja aeglase komponendi (40%) elueaks 2,3 ms. Võrrandi 5 järgi arutati ARC-1491 luminesentssignaali keskmiseks elueaks 0,75 ms ja ARC-1492 keskmiseks elueaks 2,0 ms.



Joonis 15: ARC-1491 ja ARC-1492 luminesentssignaali kustumine.



Joonis 16: Normaliseeritud ARC-1491 ja ARC-1492 luminesentssignaali kustumine.



## 6. Tulemuste arutelu

### 6.1. Proliinlikneri süntees

Selles töös sünteesiti di- ja tertaproliinlinker. Linkerite kokkuvõtlik sünteesiskeem on Joonisel 11.

Selles töös sünteesiti grammiskaalas kaitstud N- ja C-terminaliga diproliin (**1a**) kahel meetodil. Esimese meetodi puhul toimus reaktsioon DMF-is ja happe aktiveerimiseks kasutati HBTU-d. Selle reaktsiooni saagis oli 61%. Saagise parandamiseks otsustati järgida kirjanduses varasemalt kirjeldatud eeskirja, kus reaktsioon toimus DMF/CH<sub>2</sub>Cl segus ja happe aktiveerimiseks kasutati HOBt-i ja EDC-d. Selle reaktsiooni saagis oli aga madalam kui esimese meetodi puhul – vaid 30%.

Seejärel eemaldati osalt produktist **1a** C-terminali kaitserühm (metüülrühm) LiOH-ga seebistamise teel ja saadi produkt **1b**. Selle reaktsiooni saagis oli 82%.

**1a**-lt N-terminali kaitserühma eemaldamiseks prooviti kolme meetodit. Esmalt kasutati Boc-rühma eemaldamiseks reaktsiooni TFA-ga. TFA on üks enim kasutatavatest reagentidest Boc-rühma eemaldamiseks, eriti tahkefaasi sünteesis. Selle eelisteks on lahustuvus orgaanilistes lahustites ja suhteliselt madal keemistemperatuur, puudusteks aga kallis hind ja keskkonnaohtlikkus. Selle reaktsiooni saagist ei olnud võimalik hinnata, sest reaktsioonisegu ei saadud piisavalt kuivaks ja lahustijääkide tõttu tuli näiline saagis teoreetilisest suurem. Seejärel kasutati Boc-rühma eemaldamiseks paratolueensulfoonhapet. Selle reaktsiooni saagist ei olnud võimalik hinnata, kuna reageerimata paratolueensulfoonhapet ei saa eemaldada produktist rotaatoraurusti abil. Kolmandaks kasutati Boc-rühma eemaldamiseks 35% HCl lahust, selle reaktsiooni saagis oli 93%.

Tetraproliini sünteesi prooviti viie erineva meetodiga, varieerides nii aminorühmaga seotud aniooni kui ka happerühma aktivaatoreid. Esimese meetodi puhul kasutati TFA-ga seotud amiini (**1d**) ja aktivaatorina HBTU-d ja puhastamiseks kasutati ekstraheerimist etüülatsetaadiga. Selle reaktsiooni produkti saadi liiga vähe, et saagist hinnata. Järgmise kolme meetodi puhul kasutati HCl-ga seotud amiini (**1e**) ja kolme eri aktivaatorit: HBTU-d, EDC-d ja PyAOP-d. Need reaktsioonid viidi läbi milligrammiskaalas ependorfides ja saadusi uuriti HPLC MS-ga. Kromatogrammidele oli näha, et EDC-ga aktiveeritud reaktsioonisegus oli produkti kõrvalproduktidega võrreldes suhteliselt vähe. HBTU-ga aktiveeritud

reaktsioonisegus sisaldas palju nii produkti kui ka kõrvalprodukte. PyAOP-ga aktiveeritud reaktsioonisegus oli kõrvalprodukte kõige vähem.

Lisaks analüüsiti HPLC-ga reaktsiooni a ekstraheerimisest üle jäänud veekihti. Leiti, et veekiht sisaldas olulisel määral produkti **1a**. Järeldati, et reaktsioonid kulgesid hästi, kuid kõigil juhtudel kasutatud ekstraheerimise skeem ei töötanud, sest produkt lahustus liiga palju vees.

Ühendite vees lahustuvuse vähendamiseks sünteesiti hüdrofoobse bensüülrühmaga kaitstud proliin **0a**, mida kasutati järgmistes sünteesides lähteainena. Reaktsiooni saagis oli 94%.

Sünteesiti diproliin **1a\***, milles karboksüülrühm oli kaitstud bensüülrühmaga. Produkti ekstraheeriti sama skeemi järgi, mida kasutati **1a** ekstraheerimiseks. Saadi kvantitatiivne saagis. Seejärel eemaldati **1a\*** Boc-kaitserühm, saadi aine **1e\*** (kvantitatiivne saagis). **1e\*** ja **1b** reageerimisel saadi tetraproliin **2a\***.

Tetraproliin **2a\*** hilisemal analüüsimisel HPLC-ga selgus, et sünteesitud produkt sisaldas siiski olulisel määral ainet **1a\***. Seda kõrvalprodukti ei leitud TLC käigus, kuna **2a\*** ja **1a\***  $R_f$  väärtused  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 eluendi kasutamisel on väga sarnased ja seetõttu ained ei lahutunud TLC plaadil. Järeldati, et kaitserühmade eemaldamine ei olnud piisavalt efektiivne. Tulevikus plaanitakse pikendada kaitserühma eemaldamise etappide reaktsiooniaegu, et reaktsioonid kulgeksid lõpuni ning hoolsamalt kontrollide vaheproduktide koostiseid.

Ainelt **2a\*** eemaldati esmalt Bn-kaitserühm, kuna leiti, et seda on võimalik eemaldada selektiivsemalt, kui Boc-kaitserühma.

## 6.2. Tiofeeni sisaldavate ühendite süntees

Sünteesiti tiofeeni sisaldav aine **3** saagisega 77%, saagis oli sarnane kirjanduses toodud saagisega [1]. Sellele lisati piperasiin, mille kaudu on võimalik tiofeeni ühendada proliinlinkeriga. Saadi aine **4** (kvantitatiivne saagis). Mõlema produkti puhtust hinnati TMR-analüüsiga, kõrvalprodukte ei leitud.

## 6.3. ARC-ide süntees

Tiofeeni sisaldavale ainele **4** lisati produktide **2a\*** ja **1a\*** segu, saadi produktide **5** ja **6** segu. Produkte **5** ja **6** püüti eraldada kolonnkromatograafia abil. Selleks leiti eluendisegu, milles **5** ja **6** eraldusid –  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{TEA}$  84:15:0,8. Selles eluendis oli aine **5**  $R_f = 0,82$  ja aine **6**  $R_f =$

0,79. Siiski ei olnud võimalik kolonnkromatograafia abil aineid lahutada, kuna nende  $R_f$  väärtused olid liiga sarnased.

Eemaldati ainete **5** ja **6** Boc-kaitserühm. Pärast seda etappi puhastati produktid **5d** ja **6d** HPLC-ga. Ainet **5d** saadi 300 nmol ja ainet **6d** 150 nmol.

Ainetele **5d** ja **6d** lisati fluorestsentsvärv 5-TAMRA aktiveeritud estri kujul. HPLC-analüüsiga leiti, et produkte oli tekkinud väga vähe. Järeldati, et 5-TAMRA-SE kvaliteet oli ajas langenud, ning reaktsioonisegusse oli vaja lisada aktivaatorit (HBTU-d). **5d** ühendamisel 5-TAMRA-ga saadi kaht proliini sisaldav ARC-1491 ja **6d** ühendamisel 5-TAMRA-ga saadi nelja proliini sisaldav ARC-1492.

#### **6.4. ARC-ide luminescentsomaduste määramine**

Määrati ARC-1491 ja ARC-1492 ergastus- ja emissioonispektrid ning luminescentssignaali kustumise eluiga.

Ergastus- ja emissioonispektreid mõõdeti aegviivitusega. Näidati, et ARC-ide ergastusspekter langeb kokku kasutatud tiofeeniühendi ergastusspektriga ja ARC-ide emissioonispekter langeb kokku 5-TAMRA emissioonispektriga. See näitab, et kogu aeglane emissioon toimub läbi tiofeense fragmendi ergastuse ning TS-FRET on väga efektiivne, sest doonori fosforestsentsile vastavat kiirgust ei ole näha.

Luminescentssignaali kustumist mõõdeti samuti aegviivitusega režiimis. ARC-ide eluead arvutati nii ühe- kui ka kaheeksponentsiaalse mudeli järgi. Üheeksponentsiaalse mudeli järgi saadi ARC-1491 luminescentssignaali elueaks 0,46 ms ja ARC-1492 elueaks 1,2 ms. Kaheeksponentsiaalne mudel kirjeldas eksperimendi andmeid palju paremini ning selle järgi saadi järgi saadi ARC-1491 luminescentssignaali keskmiseks elueaks 0,75 ms ja ARC-1492 keskmiseks elueaks 2,0 ms. Need tulemused on sarnased magistritöös „ARC-LUM ühendite fotoluminescentsomaduste uurimine tahkes polümeermaatriksis“ saadud tulemustega, kus diproliinlinkeriga sarnase ühendi keskmiseks elueaks saadi 0,62 ms ja pentaproliinlinkeriga ühendi keskmiseks elueaks saadi 2,46 ms. Mida pikem on distant doonor- ja aktseptorluminofoori vahel, seda pikem on luminescentssignaali eluiga, kuna pikemate linkerite korral on TS-FRET-i kiirus ja efektiivsus väiksem. [2]

Võrrandi 4 järgi arvutati FRET-i efektiivsused. Doonori eluea väärtus  $\tau_D = 31,70$  ms saadi J. Jõgela magistritööst [2]. ARC-1491 korral saadi TS-FRET efektiivsuseks 0,98 ja ARC-1492 korral 0,94. Järeldati, et mõlema linkeri korral toimub FRET kiiresti ja efektiivselt. Lühema

linkeri korral toimub efektiivsemalt singlet-singlet-FRET ja seetõttu tekib vähem tripletset ergastust kui pikema linkeri korral. See paistab välja pikema linkeriga ühendi kustumiskõvera suuremast algintensiivsusest ja suuremast kõvera alusest pindalast (Joonis 16). Kustumiskõvera alune pindala on antud juhul proportsionaalne aeglase luminesentsi kvantsaagisega. Seega antud näites on pikema linkeri korral aeglast luminesentsi rohkem. See tõestab pikkade linkerite vajadust saamaks sellistes süsteemides maksimaalset aeglase luminesentsi kvantsaagist. Antud andmeid saab kasutada poolkvantitatiivse hinnangu andmiseks, sest tahkete proovide kvantitatiivse kvantsaagise määramiseks peaks kasutama integreerivat sfääri.

Joonisel 15 on näha, et ARC-1492 luminesentssignaali kustumise mõõtmisel ei jõua signaal 10 ms jooksul nulli. Edaspidi võiks mõõtmist teostada kauem, et eluea arvutamisel oleks võimalik täpsemini arvestada aeglasemate komponentide panust.

## 7. Kokkuvõte

Selle töö eesmärk oli sünteesida oligoprolinlinkereid ARC-Lum(Fluo) ühendites kasutamiseks ning leida kõige lihtsam ja odavam viis sünteeside läbi viimiseks. Linkerite sünteesil püüti vältida kalleid ja sünteesi skaalat piiravaid meetodeid (nt HPLC, süntees tahkel kandjal) ja leida sünteesiskeem, mida oleks võimalik kasutada ARC-Lum(Fluo)-de sünteesimiseks ka suuremal skaalal (grammid ja enam). Samuti sünteesiti kaks ARC-Lum(Fluo) ühendit ning mõõdeti nende ergastus- ja emissioonispektrid ja luminesentsi kustumise kiirus.

Reaktsioonide saagised jäid vahemikku 13–100%. Leiti, et sünteeside preparatiivseid saagiseid võib mõjutada ekstraheerimisetapp, kuna ka kaitstud tetraproliin lahustub teatud määral vees ja läheb seetõttu osaliselt veefaasi. Selle vähendamiseks sünteesiti hüdrofoobsem proliini bensüülester, mida kasutati edaspidi di- ja tetraproliinide sünteesides lähteainena. Kui tetraproliini õnnestub piisavalt suure saagisega sünteesida, võib edaspidi sünteesida ka pikemaid oligoprolaine, näiteks oktaproliini. Samuti võib toodud eeskirju kohandada teiste peptiidide sünteesiks lahuses.

Prolinlinkerite sünteesiks kasutatud reaktsioonid toimusid lahuses, kuid ainete puhastamisel ei õnnestunud täielikult vältida kolonnkromatograafiat ja HPLC-d, kuna tekkis di- ja tetraproliini segu. Segu tekkimist põhjustas tõenäoliselt see, et diproliinilt kaitserühmade eemaldamise etapis ei kulgenud reaktsioon lõpuni. Seda saab edaspidi vältida, pikendades reaktsiooniaegu. Töös välja toodud eeskirju on võimalik kasutada linkerite sünteesiks olulisemalt suuremas skaalas, potentsiaalselt ka ARC-Lum(Fluo) ühendite tööstuslikus sünteesis.

Produktide puhtust kontrolliti TMR-iga. TMR näitas, et produktides põhjustasid ebapuhtust põhiliselt lahustijäägid (etüülatsetaat). Samas tuleb ka mainida, et antud ühendite spektrid on väga keerukad ning nende detailne analüüs pole enamasti teostatav.

Samuti sünteesiti ARC-1491 ja ARC-1492, milles kasutati tiofeeni sisaldavat ühendit doonorluminofoorina ja 5-TAMRA-t aktseptorluminofoorina ning määrati nende eragastus- ja emissioonispektrid ning luminesentssignaali kustumise eluiga. Uuritud ARC-ide puhul kehtis seaduspära, et doonor- ja aktseptorluminofoori kauguse pikenedes väheneb FRET-i efektiivsus ja pikeneb luminesentsi eluiga.

Selles töös esitatud sünteesieeskirju saab tulevikus kasutada uute ARC-Lum(Fluo) ühendite sünteesiks, et hinnata nende ühendite sobivust OLED-ites ja teistes rakendustes kasutamiseks.

Tuleks optimeerida linkeri pikkust, et leida tasakaal efektiivse FRET-i ja pika luminesentsi eluea vahel.

## 8. Summary

The aim of this bachelor's thesis was to synthesize proline linkers to be used in ARC-Lum(Fluo) compounds, and to find the easiest and cheapest synthesis path, that avoids methods which prevent upscaling (HPLC, solid-phase peptide synthesis). Two ARC-Lum(Fluo) compounds were synthesized, one with a diproline linker and one with a tetraproline linker. Rigid proline linkers were used to fixate the distance between donor and acceptor luminophores, as the distance determines FRET efficiency and luminescence lifetime.

In this work, diproline and tetraproline with protected N- and C-termini were synthesized, reaction yields ranged from 13 to 100%. The purity of the products was checked by NMR. NMR showed that the impurity in the products was mainly caused by solvent residues (ethyl acetate).

It has been found that the yields of the syntheses can be affected by the extraction step, as protected tetraproline is soluble in water to some extent and therefore remains partially in the aqueous phase. To prevent this, a more hydrophobic benzyl ester of proline was synthesized, which was further used as a reagent in the synthesis of di- and tetraprolines. If tetraproline can be synthesized in a sufficiently high yield, longer oligoprolines, such as octaproline, can further be synthesized. The presented methods can also be adapted for the synthesis of other peptides in solution phase.

All syntheses were performed in solution. However, using column chromatography and HPLC was necessary in some steps as previous reactions were not complete. The synthesis schemes presented in the work can be used for the synthesis of linkers on a much larger scale, potentially also in the industrial synthesis of ARC-Lum(Fluo) compounds. These synthesis schemes can also be used to make new ARC-Lum(Fluo) compounds to evaluate their compatibility with OLED technology and other potential applications. The length of the linker should be optimized to find a balance between efficient FRET and long luminescence lifetime.

## 9. Kirjanduse loetelu

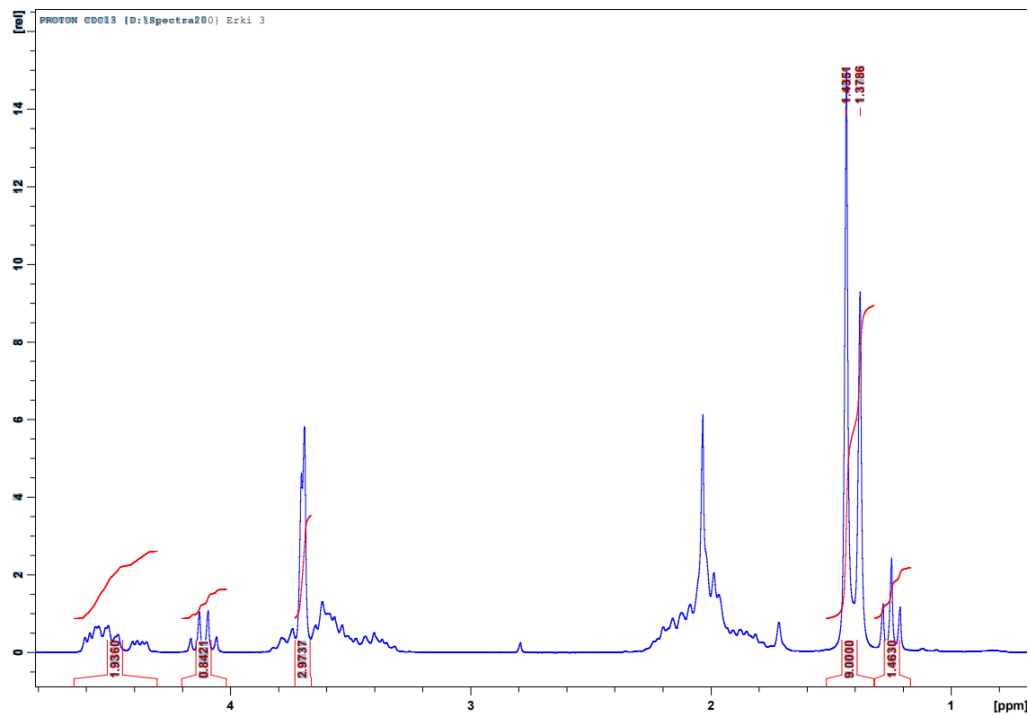
- [1] E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, M. Kriisa, T. Ivan, K. Ligi, G. Raidaru, A. Uri, Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes, *ACS Chemical Biology*. 6 (2011) 1052–1062.
- [2] J. Jõgela, ARC-LUM ühendite fotoluminestantsomaduste uurimine tahkes polümeermaatriksis, Magistritöö, Tartu Ülikool, 2017. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/59960>.
- [3] D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications, *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. 5 (2010) 23–34.
- [4] I.G. Tavares, E. Enkvist, J. Kaimre, A. Uri, F.B. Dias, Intramolecular interchromophore singlet-singlet and triplet-singlet energy transfer in a metal-free donor-acceptor emitter, *Journal of Luminescence*. 237 (2021) 118183.
- [5] H. Uoyama, K. Goushi, K. Shizu, H. Nomura, C. Adachi, Highly efficient organic light-emitting diodes from delayed fluorescence, *Nature*. 492 (2012) 234–238.
- [6] Y. Huang, E.-L. Hsiang, M.-Y. Deng, S.-T. Wu, Mini-LED, Micro-LED and OLED displays: Present status and future perspectives, *Light: Science & Applications*. 9 (2020) 1–16.
- [7] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer science & business media, 2013.
- [8] S. Mukherjee, P. Thilagar, Recent advances in purely organic phosphorescent materials, *Chemical Communications*. 51 (2015) 10988–11003. <https://doi.org/10.1039/C5CC03114A>.
- [9] B. George Abraham, K.S. Sarkisyan, A.S. Mishin, V. Santala, N.V. Tkachenko, M. Karp, Fluorescent protein based FRET pairs with improved dynamic range for fluorescence lifetime measurements, *PLoS One*. 10 (2015) e0134436.
- [10] C. Li, L. Wang, C. Yang, T. Jiang, M. Imran, I. Ahmed, M. Xiao, Y. Zhang, Multi-dressing time delayed fourth- and sixth-order fluorescence processes in Pr<sup>3+</sup>: YSO, *RSC Advances*. 5 (2015) 39449–39454. <https://doi.org/10.1039/c5ra05607a>.
- [11] K. Ligi, E. Enkvist, A. Uri, Deoxygenation Increases Photoluminescence Lifetime of Protein-Responsive Organic Probes with Triplet–Singlet Resonant Energy Transfer, *The Journal of Physical Chemistry B*. 120 (2016) 4945–4954.
- [12] I.L. Medintz, N. Hildebrandt, *FRET-Förster resonance energy transfer: from theory to applications*, John Wiley & Sons, 2013.
- [13] W. Cho, G. Sarada, H. Lee, M. Song, Y.-S. Gal, Y. Lee, S.-H. Jin, Highly efficient, conventional and flexible deep-red phosphorescent OLEDs using ambipolar thiophene/selenophene-phenylquinoline ligand-based Ir (III) complexes, *Dyes and Pigments*. 136 (2017) 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.08.060>.
- [14] B. Chen, J. Zeng, Y. Xiong, H. Nie, W. Luo, Z. Zhao, B.Z. Tang, Synthesis, aggregation-induced emission and electroluminescence of new luminogens based on thieno [3, 2-b] thiophene S, S-dioxide, *Dyes and Pigments*. 159 (2018) 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.04.069>.
- [15] A.A. Adzhubei, M.J. Sternberg, A.A. Makarov, Polyproline-II helix in proteins: structure and function, *Journal of Molecular Biology*. 425 (2013) 2100–2132.
- [16] D. Lavogina, M. Lust, I. Viil, N. König, G. Raidaru, J. Rogozina, E. Enkvist, A. Uri, D. Bossemeyer, Structural analysis of ARC-type inhibitor (ARC-1034) binding to protein kinase A catalytic subunit and rational design of bisubstrate analogue inhibitors of basophilic protein kinases, *Journal of Medicinal Chemistry*. 52 (2009) 308–321.



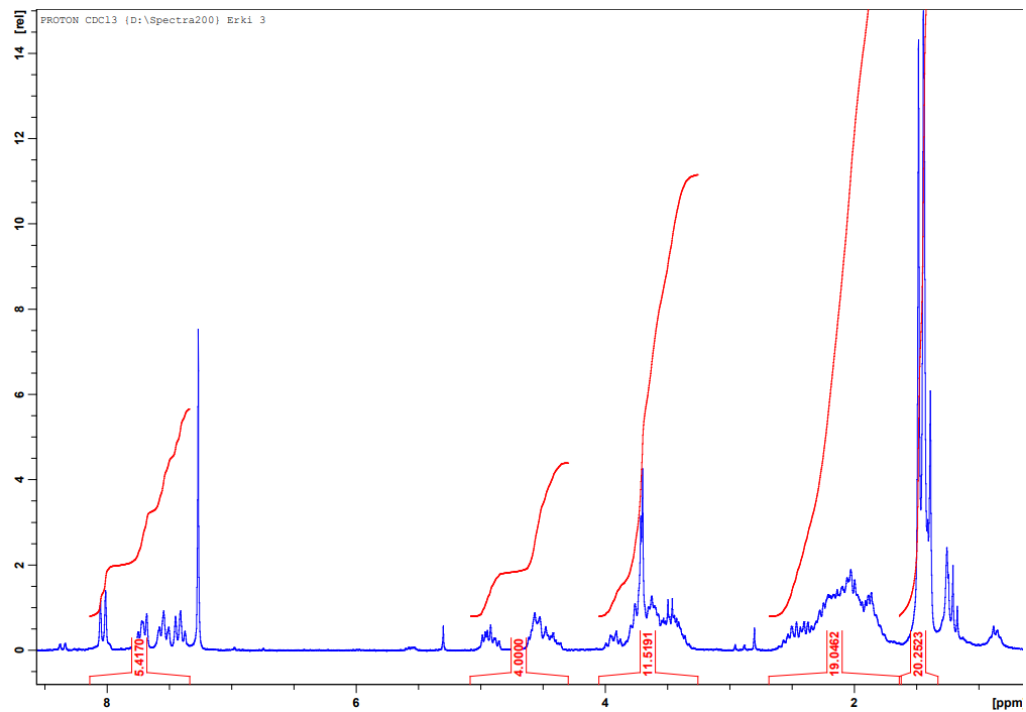
- [17] O.E. Nonga, D. Lavogina, E. Enkvist, K. Kestav, A. Chaikuad, S.E. Dixon-Clarke, A.N. Bullock, S. Kopanchuk, T. Ivan, R. Ekambaram, others, Crystal Structure-Guided Design of Bisubstrate Inhibitors and Photoluminescent Probes for Protein Kinases of the PIM Family, *Molecules*. 26 (2021) 4353.
- [18] J. Vahter, K. Viht, A. Uri, G. babu Manoharan, E. Enkvist, Thiazole-and selenazole-comprising high-affinity inhibitors possess bright microsecond-scale photoluminescence in complex with protein kinase CK2, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 26 (2018) 5062–5068.
- [19] M. Pietsch, K. Viht, A. Schnitzler, R. Ekambaram, M. Steinkrueger, E. Enkvist, C. Nienberg, A. Nickelsen, M. Lauwers, J. Jose, others, Unexpected CK2 $\beta$ -antagonistic functionality of bisubstrate inhibitors targeting protein kinase CK2, *Bioorganic Chemistry*. 96 (2020) 103608.
- [20] A. Zhang, Y. Guo, High stability of the polyproline II Helix in polypeptide bottlebrushes, *Chemistry–A European Journal*. 14 (2008) 8939–8946.  
<https://doi.org/10.1002/chem.200801191>.

## 10. Lisad

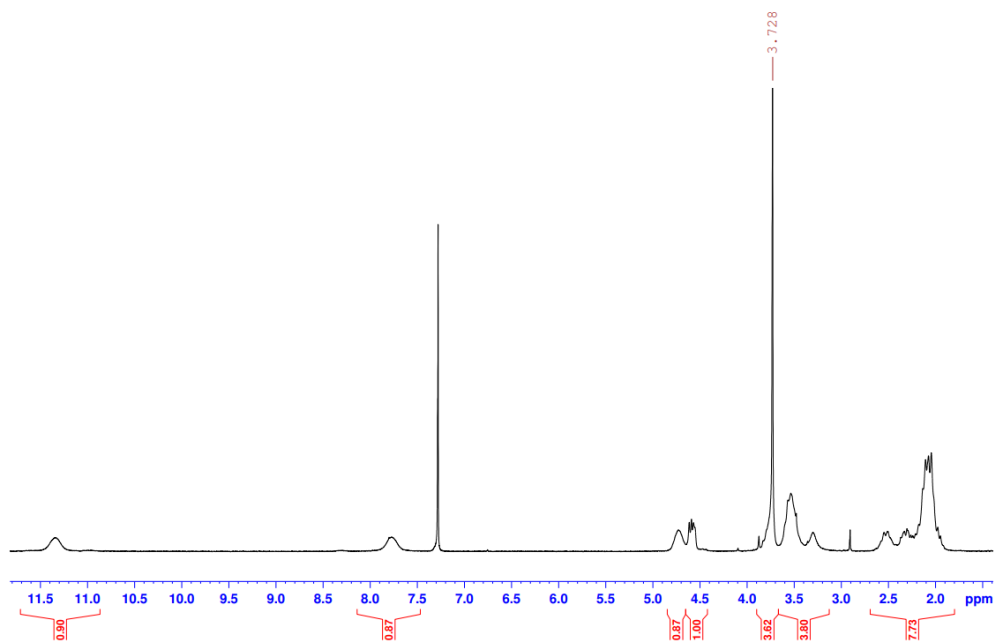
### Lisa 1. Sünteesitud ühendite TMR spektrid



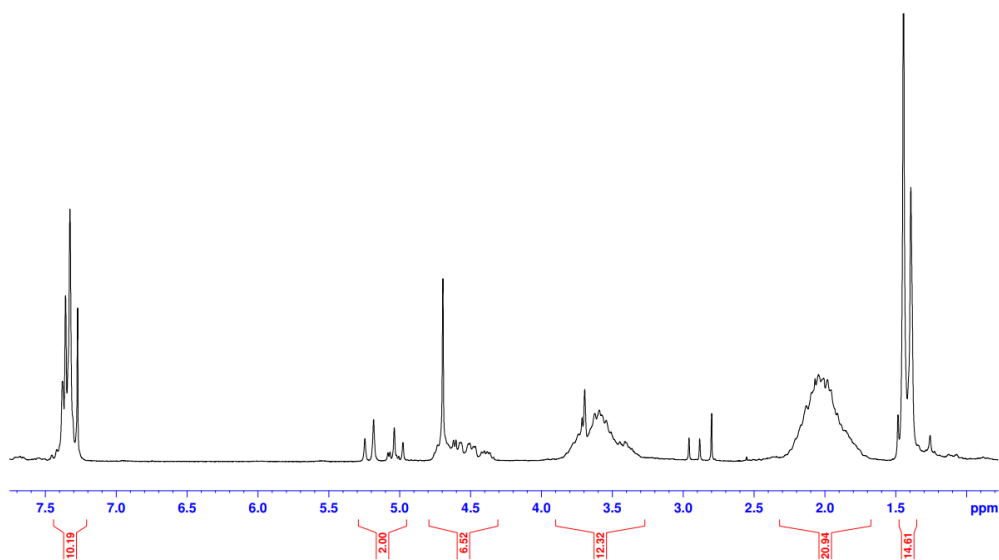
Joonis 17: **1a**, <sup>1</sup>H



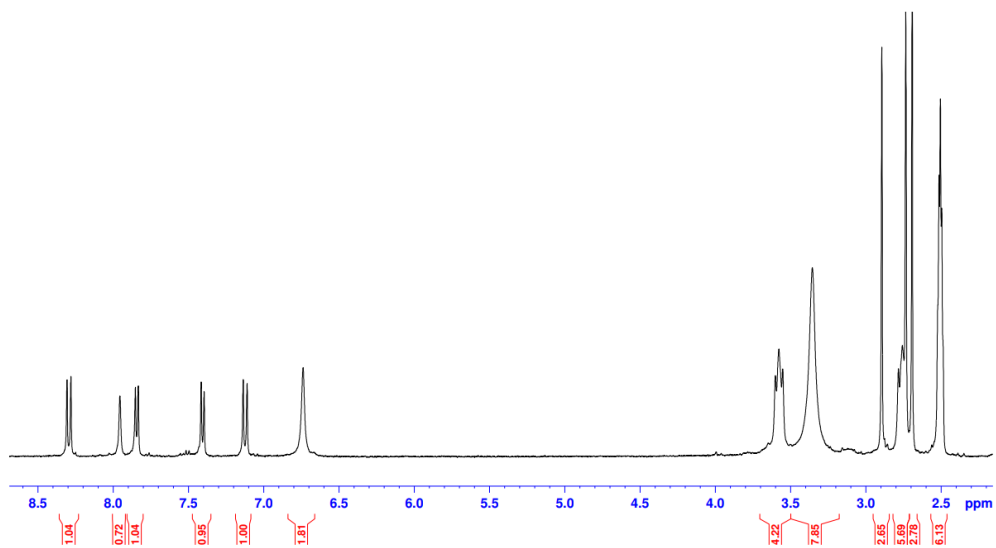
Joonis 18: **2a**, <sup>1</sup>H



Joonis 19: **1e**,  $^1\text{H}$



Joonis 20: **2a\***,  $^1\text{H}$



Joonis 21: 4,  $^1\text{H}$

## 11. Infoleht

### ARC-Lum(Fluo) ühendite sünteesimine suures skaalas

Selle bakalaureusetöö eesmärk oli sünteesida oligoproliinlinkereid ARC-Lum(Fluo) ühendites kasutamiseks ning leida kõige lihtsam ja odavam viis sünteeside läbi viimiseks. Linkerite sünteesil püüti vältida kalleid ja sünteesi skaalat piiravaid meetodeid (nt HPLC, süntees tahkel kandjal) ja leida sünteesiskeem, mida oleks võimalik kasutada ARC-Lum(Fluo)-de sünteesimiseks ka suuremal skaalal (grammid ja enam). Jätku oligoproliinlinkereid kasutati, et fikseerida kaugus doonor- ja aktseptorluminofoori vahel. Sünteesiti di- ja tetraproliinlinker ja kaks ARC-Lum(Fluo) ühendit. Sünteesid viidi läbi lahuses, produktide puhtust kontrolliti TMR-iga. Diproliini ja tetraproliini sisaldavad ühendid eraldati HPLC-ga. Mõõdeti ARC-Lum(Fluo) ergastus- ja emissioonispektrid ja luminesentsi kustumise kiirus.

Märksõnad: oligoproliin, peptiidisüntees lahuses, ARC-Lum(Fluo), FRET

### Synthesis of ARC-Lum(Fluo) compounds on a large scale

The aim of this bachelor's thesis was to synthesize proline linkers to be used in ARC-Lum(Fluo) compounds, and to find the easiest and cheapest synthesis path, that avoids methods which prevent upscaling (HPLC, solid-phase peptide synthesis). Rigid proline linkers were used to fixate the distance between donor and acceptor luminophores. A diproline linker and a tetraproline linker and two ARC-Lum(Fluo) compounds were synthesized. The syntheses were done in solution and the purity of the products was checked by NMR. Diproline and tetraproline compounds were purified by HPLC. The excitation and emission spectra and luminescence lifetimes of the ARC-Lum(Fluo) compounds were measured.

Keywords: oligoproline, liquid-phase peptide synthesis, ARC-Lum(Fluo), FRET

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Marju Vestman,

*(autori nimi)*

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose  
ARC-Lum(Fluo) ühendite sünteesimine suures skaalas,  
*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendaja on Erki Enkvist,

*(juhendaja nimi)*

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Marju Vestman*

**27.05.2022**