

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
KEEMIA INSTITUUT
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

**CK2 kinaasi lisataskusse seostuvate inhibiitorite süntees ja
iseloostamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Jaroslav Ivanov

Juhendajad: PhD Erki Enkvist

TARTU 2025

INFOLEHT

CK2 kinaasi lisataskusse seostuvate inhibiitorite süntees ja iseloomustamine

Töö keskendus modifitseeritud ARC-tüüpi inhibiitorite sünteesile, mis seostuvad CK2 kinaasi lisataskuga. Sünteesiti kolm ühendit: ARC-1502PEG ja ARC-1502HEX (mõlemad lähtudes ARC-1502-st) ning ARC-1529HEX (sünteesitud ARC-1529-st, mis omakorda valmistati peptiidide tahkefaasilise sünteesi teel). NH-PEG(6)-COOH rühma lisamine ARC-1502-le vähendas veidi selle afiinsust, kuid oluliselt vähem kui 12-hüdroksüdüdekaanhape ARC-1496-s. ARC-1529-le lisatud heks-5-üünhape toimis paremini kui NH-PEG(6)-COOH, kuigi afiinsuse erinevus ei olnud statistiliselt oluline. ARC-1529HEX afiinsuse täpsemaks hindamiseks tuleks kasutada tundlikumat fluorestseeruvat sondi. Sünteesitud ühendid ja saadud mõõtmistulemused pakuvad väärtuslikku teavet uute inhibiitorite disainiks.

Märksõnad: CK2 kinaasi lisatasku, Inhibiitorid, afiinsus, süntees, väljatõrjumis katsed. T360 Biokeemiatehnoloogia.

The Synthesis and characterization of inhibitors that bind to the α D pocket of CK2 kinase

The work focused on the synthesis of modified ARC-type inhibitors that bind to the CK2 kinase α D pocket. Three compounds were synthesized: ARC-1502PEG and ARC-1502HEX (both derived from ARC-1502), and ARC-1529HEX (synthesized from ARC-1529, which was itself resynthesized using solid-phase peptide synthesis). The addition of an NH-PEG(6)-COOH group to ARC-1502 slightly reduced its affinity, though significantly less than the 12-hydroxydodecanoic acid present in ARC-1496. The addition of hex-5-ynoic acid to ARC-1529 showed better performance than the NH-PEG(6)-COOH group, although the difference in affinity was not statistically significant. More measurements with ARC-1529HEX using a more sensitive fluorescent probe are needed to better distinguish its affinity from that of ARC-1529. The synthesized compounds and the resulting data provide valuable insight for the design of new inhibitors.

Keywords: Protein kinase CK2 α D pocket, inhibitors, affinity, synthesis, displacement experiments. T360 Biochemical technology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Proteiinkinaasid	6
1.2 Inhibiitorid.....	6
1.3 Proteiinkinaaside inhibiitorid	6
1.4 Bisubstraatsed kinaasi inhibiitorid.....	7
1.5 ARC-tüüpi inhibiitorid.....	7
1.6 Proteiinkinaas CK2	8
1.7 CK2 kinaasi bisubstraatsed inhibiitorid	8
1.8 Tahke faasi süntees	9
1.9 Fluorestsentsanisotropia ja fluorestsentspolarisatsioon (FA ja FP).....	10
1.10 Aeg-viivitusega luministsents (TGLI)	11
1.11 Hüdrofoobne lisasidumistasku CK2 kinaasis	11
1.12 IC ₅₀	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Aparatuur.....	14
2.2 Sünteesid	14
2.3 Sünteesitud ainetega katsed.....	17
2.3.1 Kinaasi aktiivsuse määramine.....	17
2.3.2 Väljatõrjumiskatsed.....	18
3. TULEMUSED JA ARUTELU	21
3.1 Sünteesitulemused	21
3.2 Väljatõrumise katsed.....	21
3.3 Järeldused	24
4. KOKKUVÕTE	25
5. SUMMARY.....	26
KASUTATUD KIRJANDUS.....	27
LISAD	30

KASUTATUD LÜHENDID

CK2 – Kaseiin-kinaas 2

Fmoc – 9-fluorenüülmetoksükarbonüül

PEG – polüetüleenglükool

PK – proteiinkinaas

K_d – tasakaaluline dissosatsioonikontsant

K_i - inhibeerimiskontstant

FP – fluorestsentspolarisatsioon

FA – fluorestsentsanisotroopia

DTT – ditiotreitool

ATP – adenosiin-5'-trifosfaat

ARC – adnosiini-analoogi ja -oligoarginiini konjungaad. Kasutatakse ka üldistatud nimetusena Asko Uri uurimisrühmas valmistatud ainetele.

TFA – Trifluoroäädikhape

HEX – heks-5-üünhape

ASB – 4-(2-amino-1,3-selenasool-5-üül)bensoehape

SISSEJUHATUS

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad valkude fosforüleerimist. Fosforüülrühma liitumise tulemusena muutuvad sihtmärkvalkude omadused. Proteiinkinaaside hälbinud toimimisega on seotud paljud inimeste haigused, näiteks vähk, diabeet, malaaria ja Alzheimeri tõbi. Seetõttu arendatakse proteiinkinaaside inhibiitoreid, mis seoksid end proteiinkinaasidega ja vähendaksid ühe või mitme proteiinkinaasi aktiivsust.

Selles töös valmistatakse ARC-e - bisubstraatseid CK2 inhibiitoreid, mis seostuvad samaaegselt ATP-sidumiskoha, substraadi sidumiskoha ja lisasidumiskohtadega, tagades seeläbi suure selektiivsuse. ARC-de multisaitne seostumine võimaldab tõhusalt inhibeerida CK2-d – olulist valku, mis on seotud kasvajate arenguga.

Selle uuringu eesmärk on arendada ARC-tüüpi inhibiitoreid, lisades nendele hüdrofoobseid struktuure ja analüüsida, kuidas lisatud struktuurid mõjutavad inhibiitori afiinsust. Hiljutises kristallstruktuuris on näidatud potentsiaalset uut sidumistaskut, kuhu need lisatud fragmendid võiksid haakuda. Fluorestsentsanisotroopia (FA) ja TGLI abil saab määratleda uute ainete sidumisafiinsuseid CK2-le ja hinnata, kuidas lisatud fragmendid mõjutavad inhibiitorite omadusi. FA meetodid põhinevad polariseeritud valguse kasutamisel. TGLI mõõtmismeetodites mõõdetakse aeglase luminesentsi intensiivsust.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid osalevad enamikes rakkudes toimuvates protsessides, sest valkude fosforüliseerimine proteiinkinaaside abil reguleeritakse rakkude ainevahetust, jagunemist, liikumist, ellujäämist ja surma. Seega võib proteiinkinaaside muutunud talitlus põhjustada mitmeid haigusi, näiteks vähk, diabeet, AID, Alzheimer'i tõbi ja kõrgeenenud vererõhk (Cozza, 2017). Sellega seoses on praegune meditsiin huvitatud ravimite väljatöötamisest, mis suudavad proteiinkinaaside inhibeerimisega haigusi ravida või peatada. Suur osa PK- inhibiitorite arendusest on keskendunud ATP-d siduvale aktiivtsentri osale PK-des, mis on evolutsiooni käigus vähe muutunud. Lisaks aktiivsusele on väga oluline ka proteiinkinaasi paiknemine rakkudes, mis sõltub nende interaktsioonidest teiste valkudega (Bogoyevitch jt., 2015).

1.2 Inhibiitorid

Inhibiitor on aine, mis seostub ensüümiga ning vähendab või täielikult peatab selle aktiivsuse. Inhibiitoreid jagatakse kahte rühma, millest ühed on pöörduvad ja teised pöördumatud. Pöörduvad inhibiitorid moodustavad ensüümiga kompleksi ning inhibiitori eemaldamisel vabaneb aktiivne ensüüm. Oma toimelt jaotatakse pöörduvad inhibiitorid konkurentseteks, mittekonkurentseteks, ebakonkurentseteks ja segatüüpi inhibiitoriteks. Vastukaaluks, pöördumatud inhibiitorid reageerivad ensüümiga sidumisel selles mõne aminohappe kõrvalahelaga, moodustades kovalentse sideme (Pinna jt., 2004). K_i on ensüümi ja inhibiitori vahelise kompleksi dissotsiatsiooni konstant, mida nimetatakse inhibeerimise konstandiks, ja selle abil iseloomustatakse ensüüminhibiitoreid (Boer jt., 2007). Ensüümide korral kasutatakse lisaks ensüümkineetika mõõtmistele ka sidumiskatseid ning siis iseloomustab inhibiitori interaktsiooni tugevust dissotsiatsiooni konstant K_d .

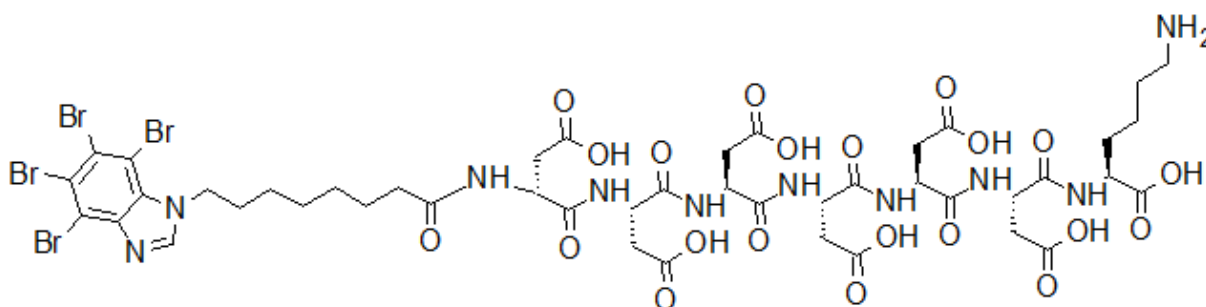
1.3 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Enamus proteiinkinaasi inhibiitorid toimivad proteiinkinaasi aktiivtsentriga sidumise teel, takistades neil spetsiifiliste valkude fosforüleerimist ja rakusiseste signaaliteede vahendamist. Levinumatel inhibiitoritel on oluline komponent, mis interakteerub ATP-sidumispaigaga ja see struktuur konkureerib rakus olemasoleva ATP-ga. Ideaalne inhibiitor võiks võimalikult selektiivselt siduda konkreetse proteiinkinaasiga, ignoreerides teisi ATP liitumiskohti (Bogoyevitch jt., 2015).

Inhibiitoride efektiivsuse analüüsimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. Kineetilised meetodid põhinevad sellel, kui palju inhibiitor aeglustab proteiinkinaasi poolt läbi viidavat valgu fosforüleerimise reaktsiooni. Sidumismeetodid põhinevad sellel, kui hästi inhibiitor seondub PK-le, ehk mõõdetakse afiinsust. Sidumise mõõtmiseks saab kasutada sonde, mis on märgistatud fluorestsentsvärviga või radioaktiivse märgisega (Uri jt., 2010).

1.4 Bisubstraatsed kinaasi inhibiitorid

Bisubstraatsed inhibiitorid koosneb kahest fragmendist ning iga fragment interakteerub ühe kinaasi sidumiskohaga. Need kaks fragmenti on kinnitatud üksteise külge linkeriga. Mõlemad inhibiitori osad on disainitud nii, et neil on tugev afiinsus ja selektiivsus konkreetse kinaasi sidumiskoha inhibeerimiseks. Bisubstraatsed inhibiitorid varieeruvad ATP konkursantse osa ja peptiid-substraadi fragmendi poolest. Linkeri tüüp ja pikkus kahe fragmendi vahel on disainitud nii, et saada optimaalseid omadusi (Lavogina jt., 2010).



Joonis 1. Bisubstraatne CK2 kinaasi inhibiitor ARC-1502

1.5 ARC-tüüpi inhibiitorid

ARC-tüüpi inhibiitorid kuuluvad bisubstraatsete või biligandsete inhibiitorite hulka. ARC-de bisubstraatne iseloom ja kõrge afiinsus võimaldab kasutada ARC-põhiseid sonde ja sensoreid proteiinkinaaside inhibiitorite iseloomustamiseks. ARC-d koosnevad nukleosiidi analoogist ja peptiidist või peptiidi analoogist, mis on ühendatud paindliku linkeri abil. ARC-il olev nukleosiidne fragment seostub kinaasi ATP sidumiskohaga ning ARC-i peptiidne osa seostub kinaasi valk-substraadi sidumiskohaga, moodustades ARC-i ja kinaasi vahel kompleksi. Mida rohkem vastastikmõjusid tekib kinaasi ja ARC-i vahel ning mida tugevamad need on, seda suurem on inhibiitori afiinsus kinaasi suhtes (väiksem K_i , K_d) ehk seda energaetiliselt soodsam on inhibiitoril ja kinaasil viibida teineteise külge seotuna kompleksis (Lavogina jt., 2010).

ARC-i afiinsust ja selektiivsust saab varieerida, kasutades nukleosiidseid fragmente, linkereid ja peptiidseid fragmente. ARC-de kõrge afiinsus säilib pärast märgistamist PEG-ga ja

fluorentseeruva värviga ning ARC-i immobiliseerimisel pinnale. See võimaldab nende baasil luua sonde ja afiinsuskandjaid. ARC-i molaarmass võib osutada liiga suureks raku plasmamembraani läbimiseks ja seetõttu mõned ARC-d sisaldavad oligoarginiini fragmenti, mis muudab neid ained plasmamembraani läbivaks. Samuti, on tehtud ARC-e mis aktiivses olekus on negatiivse laenguga, kuid on neutraalse eelravimina võimalised rakku sisenema. (Viht jt., 2015).

1.6 Proteiinkinaas CK2

CK2 proteiinkinaas on seriini/treoniini tüüpi proteiinkinaas, mida tavaliselt esineb rakkudes tetrameerina, mis sisaldab kahte katalüütilist alarühma ja kahte reguleerivat alarühma. CK2-te peetakse kõige pleiotroopsemaks proteiinkinaasiks, sest sellel on teada rohkem kui 300 substraatvalku. Nii suur variatiivsus näitab, et CK2 osaleb paljudes rakulistes protsessides nagu geeniekspressioon, rakkude kasv, rakutsükkel ja apoptoos (Luppm jt., 2013).

CK2-1 on tähtis roll tumorigeneesis ehk see on seotud paljude vähitüüpidega, sest vähirakkudes CK2 on üleekspreseeritud ja väga aktiivne. Sellega seoses tasub mainida, et vähirakud toetuvad sellele proteiinkinaasile rohkem kui teised rakud ja seepärast saab läbi CK2-e mõjutamise omakorda mõjutada ka kasvaja arengut. Kõiki neid tegureid arvesse võttes on CK2 proteiinkinaas tähtis sihtmärk ravimiarenduses (Luppm jt., 2013).

Lisaks sellele, et CK2 liigne aktiivsus põhjustab terviseprobleeme, on veel tegureid, mis muudavad just selle proteiinkinaasi potentsiaalseks ravimite sihtmärgiks. Esiteks, klassikalised signaalrajad ei sõltu CK2-st ja seepärast täiskasvanud organismid saavad paremini hakkama selle inhibitsiooniga. Teiseks, CK2-1 on väike ATP-sidumispaik, mis võimaldab luua selektiivseid ja väikse molekulmassiga inhibiitoreid (Vahter, 2014).

CX-4945 on inhibiitor, mis interakteerub CK2 ATP sidumistaskuga. See on üks enim uuritud CK2 inhibiitoreid ning praegu tehakse sellega kliiniliseid uuringuid. CX-4945 on näidanud lubavad tulemusi erinevate haiguste ravimisel, nagu näiteks kolangiokartsioom ja müeloom (Werner jt., 2023).

1.7 CK2 kinaasi bisubstraatsed inhibiitorid

Suuremas osas on CK2 kinaasi jaoks loodud ATP-konkerentsed inhibiitorid, kuna muud tüüpi inhibiitorid on näidanud väiksemat efektiivsust (Enkvist jt., 2012).

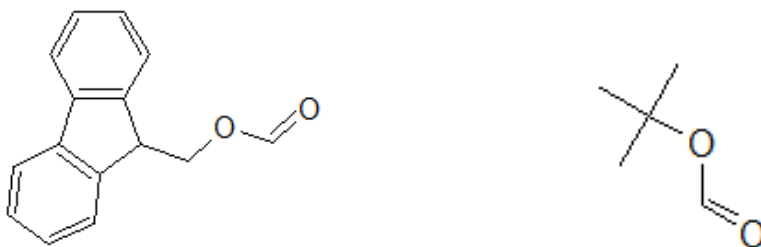
Arvestades seda, et paljud proteiinkinaasid on basofiilsed, omavad happelised bisubstraatsed inhibiitorid suurt selektiivsust CK2 suhtes selle atsidofiilsete omaduste tõttu. Nende inhibiitorite suur selektiivsus ja afiinsus lubab kasutada bisubstraatsed inhibiitoreid koos fluorestseeruva sondiga kinaasi kontsentratsiooni määramiseks ning uurida CK2 interaktsioone teiste valkudega. Seda kõike saab kasutada rakusiseselt eelravimina ning haiguste diagnostikaks ja vähiravimite loomiseks. Veelgi, bisubstraatsed inhibiitorid on suure afiinsusega ja tekitavad väga stabiilse kompleksi CK2-ga, mis omakorda aitab kaasa nende kristallimisele ja selle abil CK2 struktuuri ja funktsiooni biokeemilisele uurimisele (Enkvist jt., 2012; Rahnel jt., 2017).

1.8 Tahke faasi süntees

Tahke faasi sünteesi on esimesena kirjeldatud R. B. Merrifield'i poolt aastal 1963. Tänapäeval on tahke faasi süntees laialt kasutatud sünteesi meetod (Chan ja White, 2000).

Tahke faasi süntees teostatakse tahkel kandjal, mida eesti keeles nimetatakse ka vaiguks (inglise keeles *resin*). Kõige sagedamini kasutatakse tahke kandjana ristseotud polüstereeni. Vaigu peal on funktsionaalsed rühmad, mis on reaktsiooni tsentriteks, mille kaudu esimene aminohape seotakse vaiguga. Peptiidi sünteesi saab teha N-terminaalsest otsast või C-terminaalsest otsast. Kuna karboksüülrühma aktiveerimine vaigu peal on keeruline, siis tavaliselt sünteesi tehakse C-terminaalsest otsast N-otsa suunas. (Chan ja White, 2000)

Tahke faasi sünteesi meetodid varieeruvad sõltuvalt kasutatavast alfa-asendi aminorühma kaitserühmast. Põhilised kaitserühmad on Boc ja Fmoc. Boc-rühma saab eemaldada tugeva happega, milleks tihti on TFA. Fmoc-i saab eemaldada nõrgalt aluseliste lahustega, näiteks piperediiniga ning sellepärast on Fmoc-i kasutamine labori sünteesides sagedasem. Fmoc meetodi puhul kõrvalahelad on sageli kaitstud Boc-iga ja muude kaitserühmadega, mida saab eemaldada koos peptiidjärjestuse lõpliku eemaldamisega vaigust. Oluline on kaitsvate rühmade ortogonaalus ehk see, et me saame eemaldada erinevaid kaitsvaid rühmasid selektiivselt erinevatel tingimustel. (Chan ja White, 2000)



Joonis 2. Fmoc kaitserühm (vasakul) ja Boc kaitserühm (paremal).

Tahked kandjaid ehk vaike kasutakse ka igasuguste reagentide, katalüsaatorite ja substraatide immobiliseerimiseks. Vaigu terad on lahustamatud (enamasti peavad punduma) polümeersed materjalid ning see omadus võimaldab lihtsasti teha tahke ja vedeliku eraldamist filtreerimisega (Merrifield, 1993).

1.9 Fluorestsentsanisotroopia ja fluorestsentspolarisatsioon (FA ja FP)

Fluorestsentspolarisatsiooni kasutatakse väikeste molekulide valkudega sidumise analüüsimiseks. Fluorestsentsanisotroopia on tihedalt seotud fluorestsentspolarisatsiooniga ja selle abil mõõdetakse lahuses molekulide pöörlemist. Katse ajal ergastab fluorofoori molekuli polariseeritud valgus. Kui molekul püsib liikumatuna oma fluorestsentsi eluea jooksul, siis valguse polarisatsioon säilib. Kui aga molekul pöörleb, siis väheneb kiirgatava valguse polariseerumise määr. Kiirguse anisotroopia aste sõltub molekuli suurusest, lahuse viskoossusest ja temperatuurist, mis võimaldab seda meetodikat kasutada molekulaarsete koostoimete, näiteks valk-valk ja valk-liigand interaktsioonide uurimiseks. (Lakowicz, 2006)

Fluorestsentsanisotroopiat (r) ja Fluorestsentspolarisatsiooni (P) defineeritakse järgmiste valemitega:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

I_{\parallel} ja I_{\perp} on fluorestsentsi intensiivsused vertikaalselt ja horisontaalselt polariseeritud emissiooni puhul, kui proov oli ergastatud vertikaalselt polariseeritud valgusega (Lakowicz, 2006)

ARC-tüüpi inhibiitorite puhul on fluorestsentsanisotroopiaal põhinevad sidumismeetodid eelistatud ensüümkinetiliste katsetega võrreldes, sest selleks pole vaja kasutada spetsiaalseid substraate ja nõudlikke antikehasid ning on seega kiiremad ja odavamad. (Uri jt., 2010).

1.10 Aeg-viivitusega luministsents (TGLI)

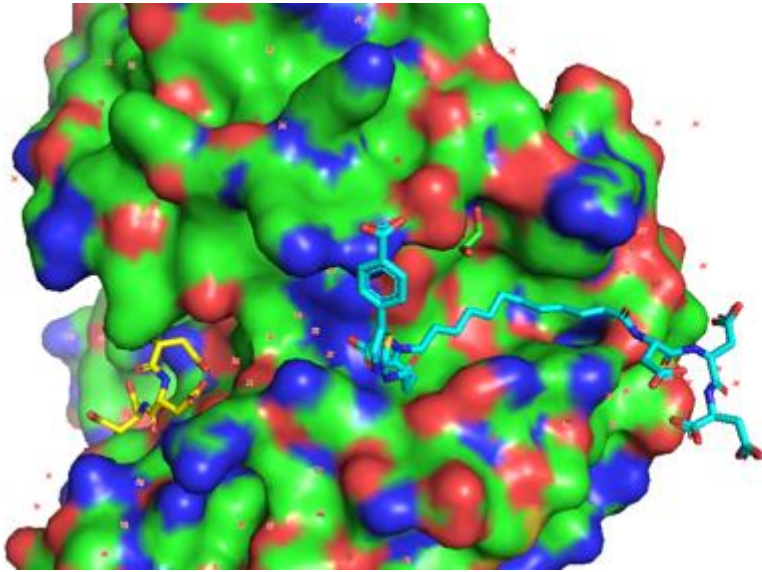
TGLI on fluorestsentspektroskoopia mõõtmismeetod, mille puhul ergastatakse proovi lühikese valguse impulsiga ja seejärel mõõdetakse pärast lühikest viivitust eralduva luminestsentsi intensiivsust. Luminestsentsi viivitus on tavaliselt mikro- või millisekundites ja võimaldab lühiajalisel taustfluorestsentsil (tavaliselt bioloogilistest materjalidest või muudest segavatest ainetest) kustuda, minimeerides sellega segavate signaalide mõju. See muudab TGL-i eriti kasulikuks pikaealiste luminestsentsisignaalide mõõtmisel, mis kiirgavad valgust ka pärast esialgse impulsi ja tausta fluorestsentsi lõppemist (Enkvist jt., 2011).

Luminestsentsi intensiivsust analüüsitakse, et koguda informatsiooni proovi kohta, näiteks konkreetsete ionide või molekulide olemasolu, energiaülekanne protsesside efektiivsuse, molekulaarsete vastastikmõjude ja muude omaduste kohta, mis sõltuvad proovi luminestsentsi omadustest. Toatemperatuuril ja vesilahuses emiteerivad pika elueaga luminestsentsi väga vähesed ained, millest tuntumad on lahtaniidide kompleksid. Samuti on selliste omadustega orgaaniliste ainete baasil loodud ARC-Lum sondid (Enkvist jt., 2011).

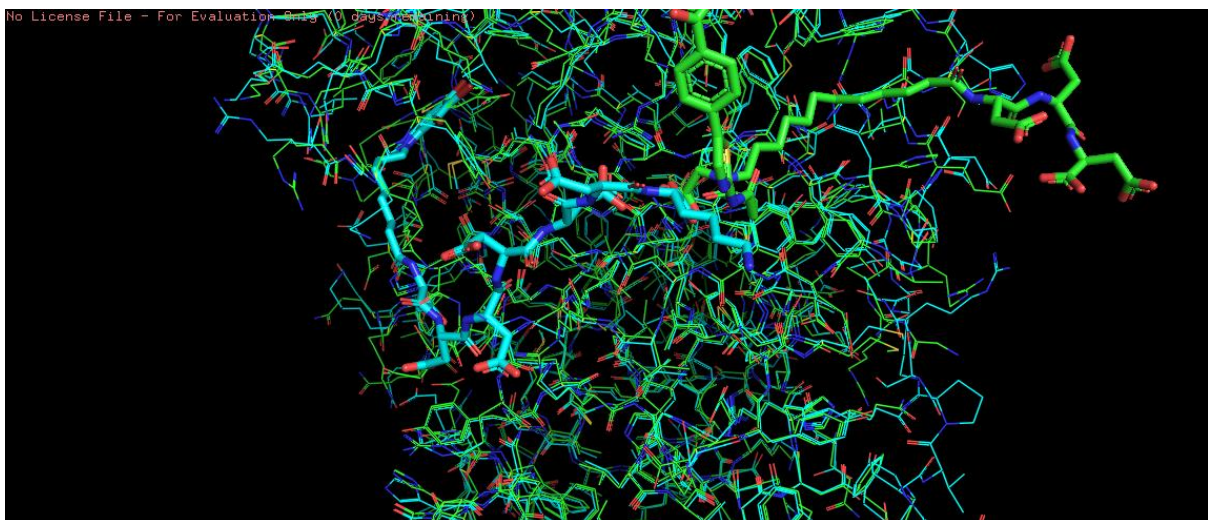
1.11 Hüdrofoobne lisandumistasku CK2 kinaasis

CK2 kinaasil on 2 tüüpi katalüütilisi subühikuid (α ja α'), mis on aminohappelise järjestuse ja omaduste poolest sarnased. Enamasti seostuvad CK2 inhibiitorid katalüütilisse taskusse, kuhu seostuvad substraatideks olevad ATP ja valk. Hiljuti avastati kristallstruktuuris, et katalüütilise tasku kõrval on veel hüdrofoobne tasku, kuhu võiksid ained seostuda, kuid mille vastavat funktsionaalsust ei ole katsetega näidatud (Werner jt., 2023).

Hüdrofoobne lisandumistasku asub CK2 kinaasi katalüütilises subühikus α . See on ala, kus aminohappejäägid moodustavad peamiselt hüdrofoobseid koostoimeid, muutes selle atraktiivseks kohaks väikeste molekulide, sealhulgas inhibiitorite sidumiseks. Inhibiitorid, mis on välja töötatud CK2 hüdrofoobse lisandumistasku sidumiseks, võivad tugevalt vähendada selle kinaasi aktiivsust või suurendada inhibiitorite selektiivsust, võrreldes inhibiitoritega, kus ei ole lisatud hüdrofoobseid rühmasid. Selle tasku hõivamise jaoks on võimalik lisada olemasolevatele inhibiitoritele hüdrofoobseid rühmi, mis seoks end CK2 lisandumistaskuga (Werner jt., 2023).



Joonis 3. Kaks ARC-780 molekuli CK2 kompleksis. Kollasena vasakul paikneb aktiivstentris (ATP tasku jääb antud vaates nurga taha). Helesinine (paremal) on seotud nõ lisataskusse (PDB kood 8Q77).



Joonis 4. Superpositsioonis ARC-1502 (helesinine, avaldamata struktuur) ja lisataskusse seotud ARC-780 (roheline, PDB kood 8Q77). Näha on, et ARC-1502 lüsiin paikneb lisataskusse seotud hüdrofoobse linkeri lähedal.

1.12 IC₅₀

IC₅₀ on inhibiitori kontsentratsioon, mille juures mõõdetav protsess on inhibeeritud 50% võrra. See on ligandi efektiivsuse näitaja biokeemilise või bioloogilise inhibeerimise protsessis. IC₅₀ on kvantitatiivne indikaator, mis näitab ligandi (inhibiitori) tugevust (Cheng ja Prusoff, 1973).

IC₅₀ ei näita afiinsust otseselt, vaid on sellega tihedalt seotud. Selle seost K_i-ga saab iseloomustada järgmise valemiga:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Joonis 5. Cheng-Prusoff'i valem, kus K_i – substraadi ja inhibiitori sidumise afiinsus, [S] – substraadi kontsentratsioon ja K_m – Michaelis-Menten konstant. -Valemit saab rakendada ka konkurentse sidumise katsete korral.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

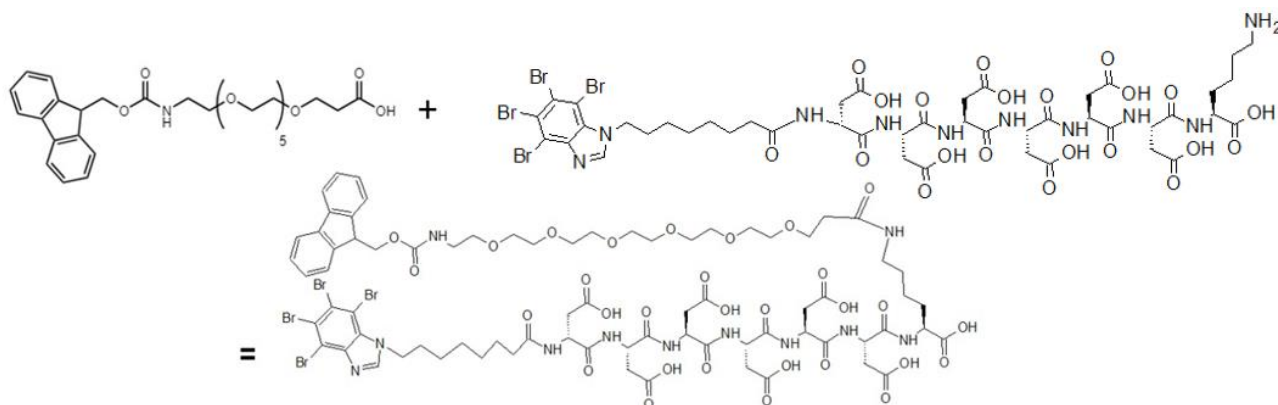
2.1 Aparatuur

Vedelikkromatograafilist puhastamist teostati Shimadzu Prominence HPLC vedelikkromatograafiga SPD M20A diodrida detektoriga ja kasutati C18 5 μm kolonni, mis oli kaitstud 5 μm Gemini eelkolonniga. Elueerimiseks kasutati vett 0,1% TFA-ga ja atseetonitriili 0,1% TFA-ga. Valguse neelduvust mõõdeti spektromeetri NanoDrop 2000c ning mille järgi kontrolliti üle alglahuste kontsentratsioonid, mis arvutati välja Lamber-Beeri seadusega $A = \epsilon c l$. FA, FP, TGLI ja kineetika mõõtmises kasutati PHERAstar mikroplaadilugejat (BMG Labtech). Ainete lahjendusseeriaid tehti mikrotiiter plaadi peal. Molekulide struktuuride ja molekulaarmasside väljaarvutamiseks kasutati programmi ChemSketch.

2.2 Sünteesid

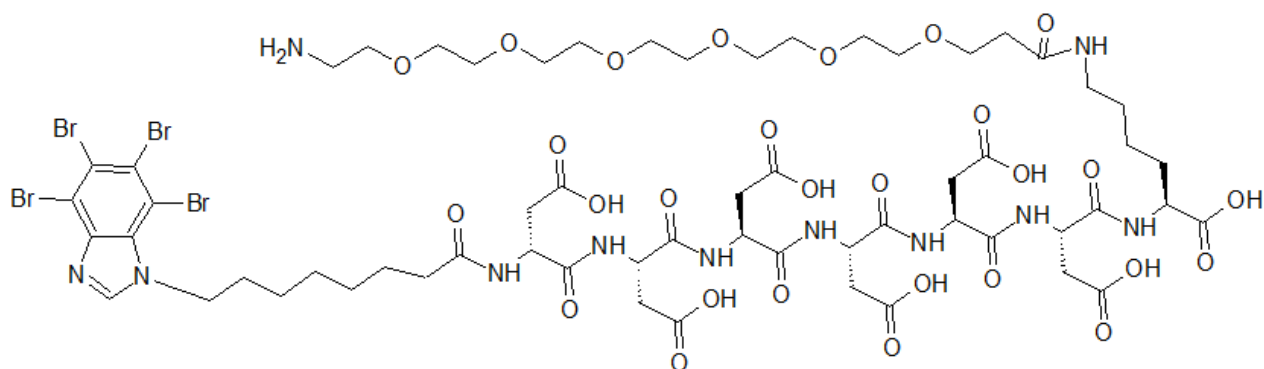
ARC-1502PEG süntees

469 nmol Fmoc-NH-PEG(6)-COOH aktiveeriti 422 nmol HBTU-ga ja 6 eq NMM-ga 1,5 ml plastiktubis ja jäeti seisma kolmeks minutiks. Seejärel lisati see segu 100 nanomoolile ARC-1502le. Reaktsiooni segu jäeti kaheks tunniks seisma. Solvendid eraldati vaakumsentrifuugiga. Seejärel eraldati produkt HPLC-ga ja saadi ARC-1502PEG Fmoc rühmaga.



Joonis 6. Fmoc-NH-PEG(6)-COOH ja ARC-1502 reaktsioon HBTU ja NMM juuresolekul. Saadi ARC-1502PEG Fmoc rühmaga.

Pärast ARC-1502PEG-ist eemaldatakse Fmoc rühma 20% piperediini lahuse abil. Solvendid eraldati vaakumsentrifuugiga. Seejärel eraldati produkt HPLC-ga ja saadi ARC-1502PEG.

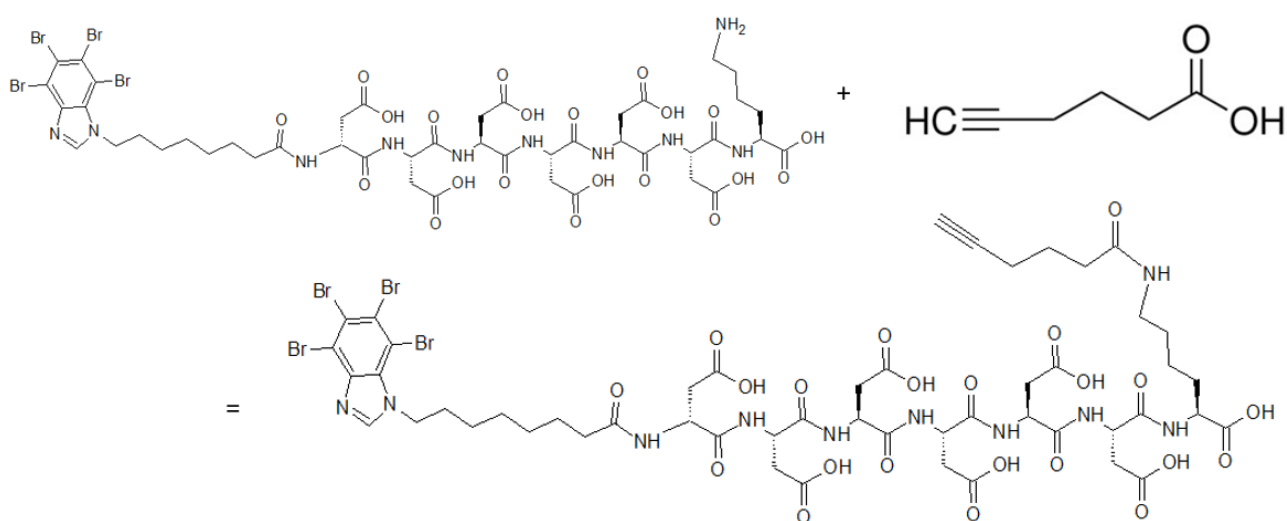


Joonis 7. ARC-1502PEG struktuur

Sünteesprodukti hulk mõõdeti spektromeetriga NanoDrop 2000c abil. Ainete neelduvused mõõdeti lainepikkusel 272 nm. Sünteesitud aine hulk oli 43 nmol. Sünteesi saagiseks sai 43% $M_w(\text{ARC-1502PEG}) = 1730 \text{ g/mol}$

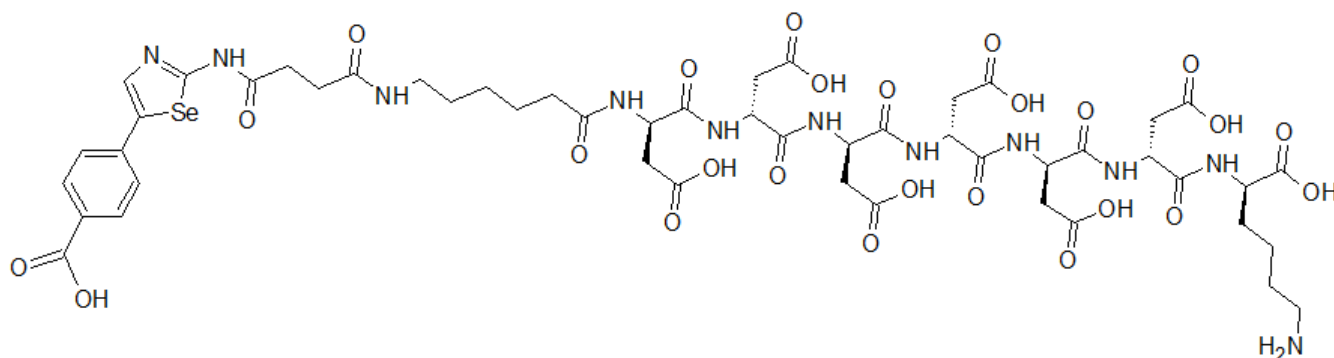
ARC-1502HEX Süntees

700 nmol heks-5-üünhapet aktiveeriti 0,9 eq HBTU-ga ja 2 eq NMM 1,5 ml plastiktuubis ja jäeti seisma kolmeks minutiks. Pärast lisati 610 nmol aktiveeritud heks-5-üünhapet 220 nanomoolile ARC-1502-le. Reaktsiooni segu jäeti kaheks tunniks seisma. Solvendid eemaldati vaakumsentrifuugiga. Seejärel eraldati produkt HPLC-ga ja saadi ARC-1502HEX.



Joonis 8. ARC-1502 ja heks-5-üünhape reaktsioon HBTU ja NMM juuresolekul. Saadi ARC-1502HEX.

Sünteesprodukti mõõdeti spektromeetri NanoDrop 2000c abil. Ainete neelduvused olid mõõdetud lainepikkusel 272 nm. Sünteesitud aine hulk oli 153 nmol. Sünteesi saagiseks sai 70% $M(\text{ARC-1502HEX}) = 1601,8 \text{ g/mol}$



Joonis 9. ARC-1502HEX struktuur

ARC-1529 süntees

ARC-1529 süntees viidi läbi tahke faasi sünteesina. Tahke faasi sünteesil eemaldatakse aminorühma kaitserühm ning lisatakse aktiveeritud karboksüülhapet, et tekiks amiidside. Seda protsessi kordatakse mitu korda, kuni saadakse vajalik järjestus.

Eelviimase etappi lähteaine valmistamise jaoks segati 0,033 mmol ASB ja 0,0495 mmol suktsinaadi anhüdriidi (lahustiks 650 μl DMF) ja jäeti see segu üheks päevaks 65°C juurde seisma. Ühe päeva pärast tehti ASB ja suktsinaadi anhüdriidi segu vedeliku ekstraheerimist kasutades etüülatsetaadi ja vee segu. Orgaanika kiht eemaldati, kuivatati ja arutati kuivaks. Seejärel lisati saadud fragment peptiidiahelale nagu eelnevad tükid.

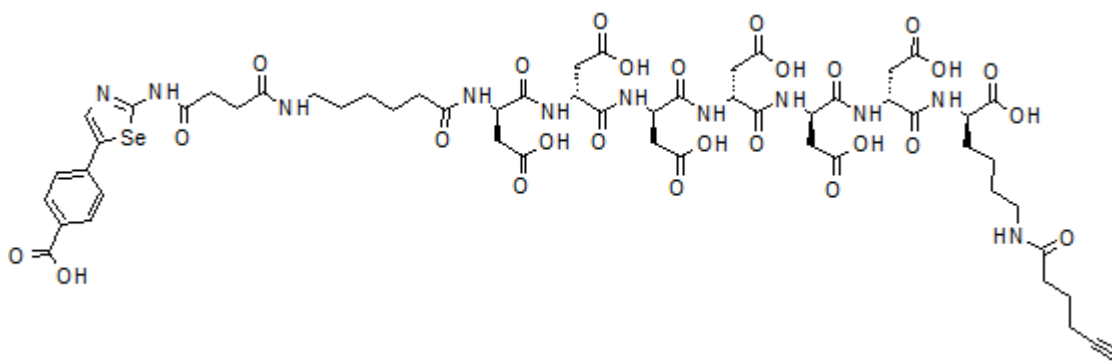
Kui vajalik molekul oli resinil tehtud, siis viimaseks etapiks oli selle molekuli tahkelt kandjalt eemaldamine (kliivimine).

Süntees viidi läbi tahke faasi sünteesina. Igas etapis toimus Fmoc kaitserühma eemaldamine 20% piperediini lahusega 3+17 min. Alustati 100 mg (0,06 mmol) Fmoc-D-lys(BoC) Wang Resiniga. Igal sidumisetapil lisati 3 eq Fmoc-D-asp(tBu)-OH, 2,95 eq HBTU-d ja selle reaktsioonisegule lisati 9eq 4-metüülmorfoliini, segu seisis kolm minutit ja kanti siis resinile ning järgnes üks tund loksutamist. Pärast iga kaitse eemaldamist ja ainete lisamist järgnes ~2

ml DMF-ga pesu viis korda. Viimases etapis lisati ASB-sukstsinaadi segu koos 12,7 mg HTBU-ga ja 60 µl 4-metüülmorfoliiniga lisati vaigule ja jäeti loksuma kaheks tunniks. Produkti eemaldamiseks tahkelt kandjalt kasutati TFA, TIS ja vee segu. Seejärel eraldati produkt HPLC-ga ja saadi 267,4 nmol M(ARC-1529) = 1299 g/mol (osa ainet jäi alles ka toorseguna).

ARC-1529HEX süntees

200 nmol heks-5-üünhapet aktiveeriti 180 nmol HBTU-ga ning lisati 500 nmol 4-metüülmorfoliini. 1,5 ml plastikuubi jäeti seisma kolmeks minutiks. Pärast see segu lisati 100 nmol ARC-1529-le. Reaktsioonisegu jäeti reageerima kaheks tunniks. Seejärel eraldati produkt HPLC-ga ja saadi M(ARC-1529HEX) = 1393 g/mol.



Joonis 10. ARC-1529HEX struktuur

Sünteesprodukti mõõdeti spektromeetri NanoDrop 2000c abil. Ainete neelduvused olid mõõdetud lainepikkusel 320 nm. Sünteesitud aine saagis oli 14%.

2.3 Sünteesitud ainetega katsed

2.3.1 Kinaasi aktiivsuse määramine

Kõikide ühendite (v.a. CK2) kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop2000c abil. Selleks, et teada saada aktiivse ensüümi protsent tehti CK2 kinaasi lahjendusseeriat ja lisati sondi lahusele. Selleks kasutati sama sondi, mis kasutati pärast väljatõrjumiskatsetes. Lahjendusseeria algas 500 nM CK2 kontsentratsiooniga ja vähenes 2 korda igal lahjenemisel. Fluorestseeruva sondi kontsentratsiooniks oli 3 nM. Negatiivseks kontrolliks oli puhver koos 3 nM fluorestseeruva sondiga. Ainete lahjendusseeriaid tehti mikrotiiter plaadi peal. Saadud graafikute järgi arvutati

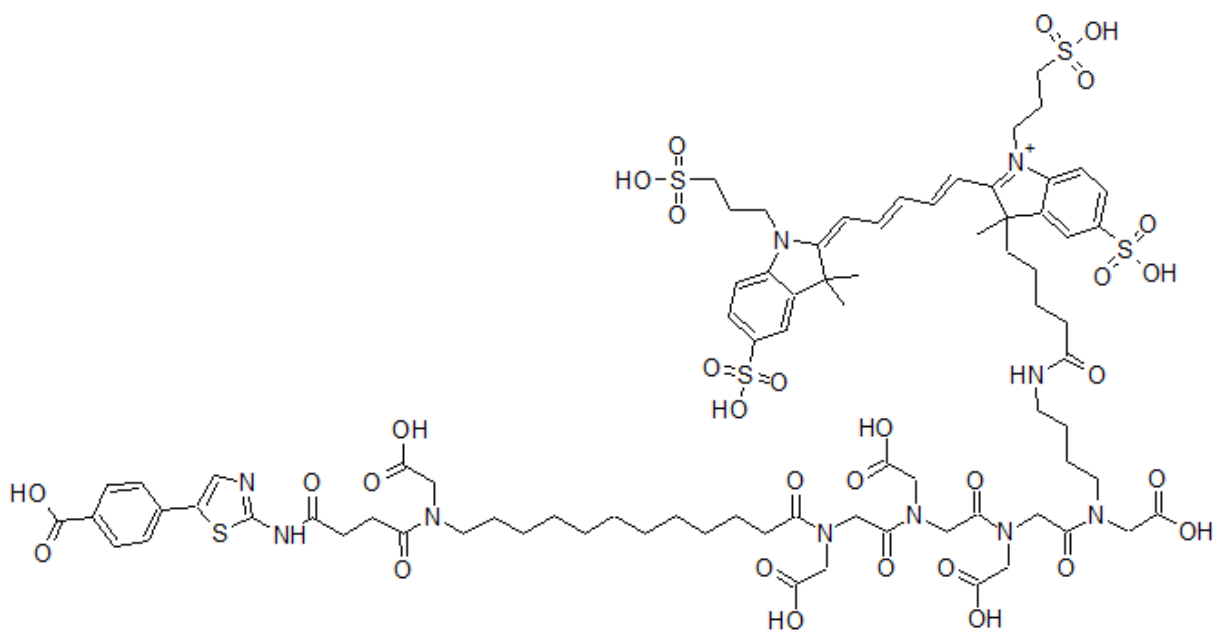
tiitrimiskõvera järgi aktiivse kinaasi kontsentratsiooni ning sellest lähtuvalt võeti vajalik ensüümi hulk väljatõrjumiskatseteks.

Väljatõrjumiskatsetel lahuste ja lahendusseeriade tegemiseks kasutati B3 ja B5 puhvreid. B3 puhvri koostisosad on: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl ja 0,005% P₂₀. B5 puhvri koostisosad on: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P₂₀, 0,5 mg/ml BSA ja 5 mM DTT.

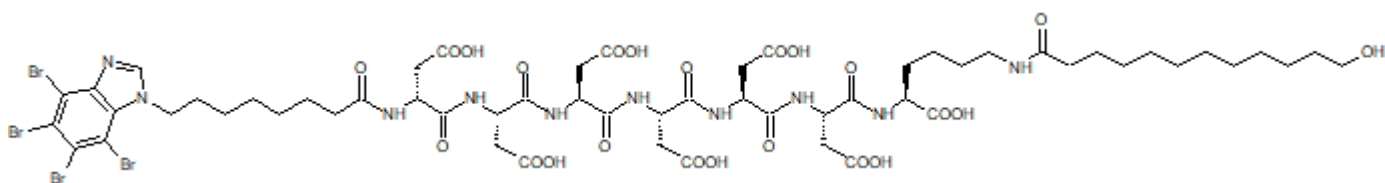
2.3.2 Väljatõrjumiskatsed

ARC-1502PEG

ARC-1502PEG väljatõrjumise katses kasutati võrdluseks aineid: ARC-1502 ja ARC-1496. ARC-1496 on ARC-1502, millele on lisatud 12-hüdroksüdüodekaanhape (ARC-1502-DDA-OH). Fluorestseeruvaks sondiks oli ARC-784.



Joonis 11. ARC-784 struktuur.



Joonis 12. ARC-1496 struktuur.

Pärast CK2 kinaasi lahjendusseeria mõõtmist ilmnes, et 78% CK2 on aktiivne.

Väljatõrjumise katses tehti ARC-1502PEG, ARC-1502 ja ARC-1496 kolmekordsed lahjendused. Lahjenduste seeria algas 10 µM ja vähenes 3 korda pärast iga lahjenemist. Seejärel lisati ARC-784 ja CK2 kompleksi 3+2 nM vastavalt. Kontrolliks oli puhver 3+2 ARC-784 ja CK2 kompleksiga ning vabasond 3nM ARC-784.

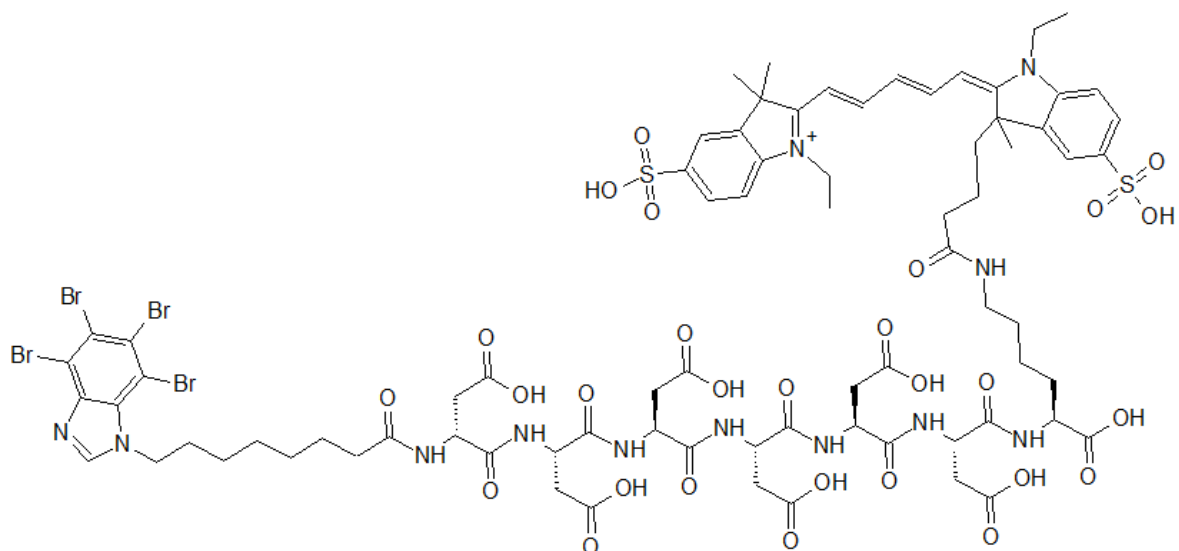
ARC-1502HEX

ARC-1502HEX väljatõrjumise katses kasutati võrdluseks tavalist ARC-1502 ja ARC-1496. Fluorestseeruvaks sondiks oli ARC-784. Pärast CK2 kinaasi lahjendusseeria mõõtmist ilmnes, et 55% CK2 on aktiivne.

Väljatõrjumise katses tehti ARC-1502HEX, ARC-1502 ja ARC-1496 kolmekordsed lahjendused. Lahjenduste seeria algas 10 µM ja vähenes 3 korda pärast iga lahjendamist. Seejärel lisati ARC-784 ja CK2 kompleksi 0,75 nM +2 nM vastavalt. Kontrolliks oli puhver 0,75 nM + 2 nM ARC-784 ja CK2 kompleksiga ning vabasond 0,75 nM ARC-784.

ARC-1529HEX

ARC-1529HEX väljatõrjumise katses kasutati võrdluseks tavalist ARC-1529. Fluorestseeruvaks sondiks oli ARC-1504.



Joonis 13. ARC-1504 struktuur.

Pärast CK2 kinaasi lahjendusseeria mõõtmist ilmnas, et 72% CK2 on aktiivne.

Väljatõrjumise katses tehti ARC-1529HEX ja ARC-1529 kolmekordsed lahjendused. Lahjenduste seeria algas 10 μ M ja vähenes 3 korda pärast iga lahjendamist. Seejärel lisati ARC-1504 ja CK2 kompleksi 2 nM + 3 nM vastavalt. Kontrolliks oli puhver 2 nM + 3 nM ARC-1504 ja CK2 kompleksiga ning vabasond 2 nM ARC-1504.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Sünteesitulemused

Sünteeside käigus saadi kolm erinevat ainet, mida kasutati väljatõrjumiskatsetes, ning nende saagised olid järgmised:

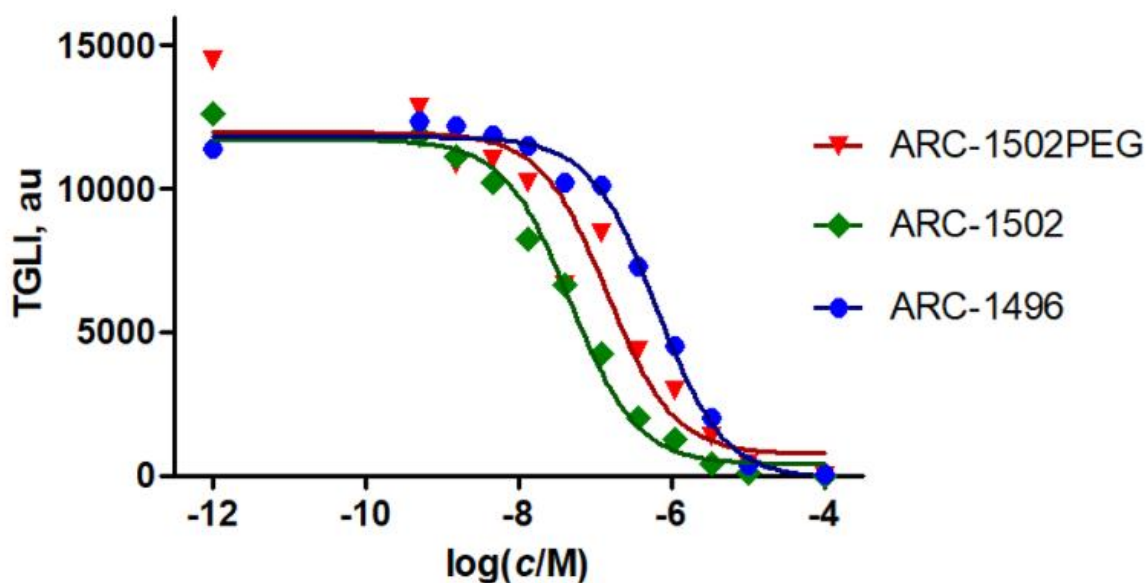
Aine	Saagis	Molaarmass
ARC-1502PEG	43%	1730 g/mol
ARC-1502HEX	70%	1601,8 g/mol
ARC-1529HEX	14%	1393 g/mol

ARC-1529HEX jaoks sünteesiti eelnevalt ARC-1529, millest puhastati 267,4 nmol ($M(\text{ARC-1529}) = 1299 \text{ g/mol}$). -saadud ainete hulgad olid piisavad järgnenud mõõtmiste katsete jaoks, kuigi rohkemate katsete jaoks sobilikul määral saadi ainult ainet ARC-1502HEX. Oodatust madalamate saagise põhjuseks võiks olla kaitsmata happerühmadega peptiidide kasutamine, mis omakorda põhjustab kõrvalreaktsioone. Veel üks põhjus on aine eraldamisel HPLC-ga esinevad kaod. Paremaid saagiseid saaks kui kogu süntees teha tahkelfaasil ja kasutada ortogonaalse kaitsvarühmaga lüsiini, selleks et lisastruktuuri saaks panna külge tahkel kandjal kui kaitsvad rühmad on veel peal.

3.2 Väljatõrumise katsed

ARC-1502PEG

Väljatõrumise katsete jooksul mõõdeti PHERAstar-iga fluorestsentsanisotroopiat, fluorestsentspolarisatsiooni, intensiivsust ja mõne reporterligandiga ka TGLI-d. TGLI tulemused on järgmised:



Joonis 14. ARC-1502PEG, ARC-1502 ja ARC-1496 väljatõrjumise kõver kasutades TGLI-d. Ainete inkubatsiooni aeg 37°C juures oli 30 minutit. Ainete IC₅₀-d on:

Aine	IC ₅₀
ARC-1502PEG	146 nM (95% usaldusintervall on 49 nM ja 435 nM vahel)
ARC-1502	48 nM (95% usaldusintervall on 32 nM ja 73 nM vahel)
ARC-1496	646 nM (95% usaldusintervall on 479 nM ja 870 nM vahel)

IC₅₀-väärtustest saab järeldada, et lisades ARC-1502 juurde lühikese polüetüleenglükooli ahela, väheneb inhibiitori afiinsus ehk selle efektiivsus võrreldes lähteainega ARC-1502 on 3 korda madalam, kuigi võrreldes ARC-1496-ga on selle afiinsus ikkagi suurem. Seega hüdrofiilse rühma lisamine antud positsiooni on paremini tolereeritud kui pika hüdrofoobse rühma oma. Pikk hüdrofoofne ahel võib põhjustada ainete agregeerumist iseendaga ja seekaudu takistada aine seostumist kinaasiga. Samas loodetud afiinsuse paranemist ei andnud kumbki testitud modifikatsioon. Seega tõenäoliselt lisatud fragment ei seostu efektiivselt lisasidumistaskusse.

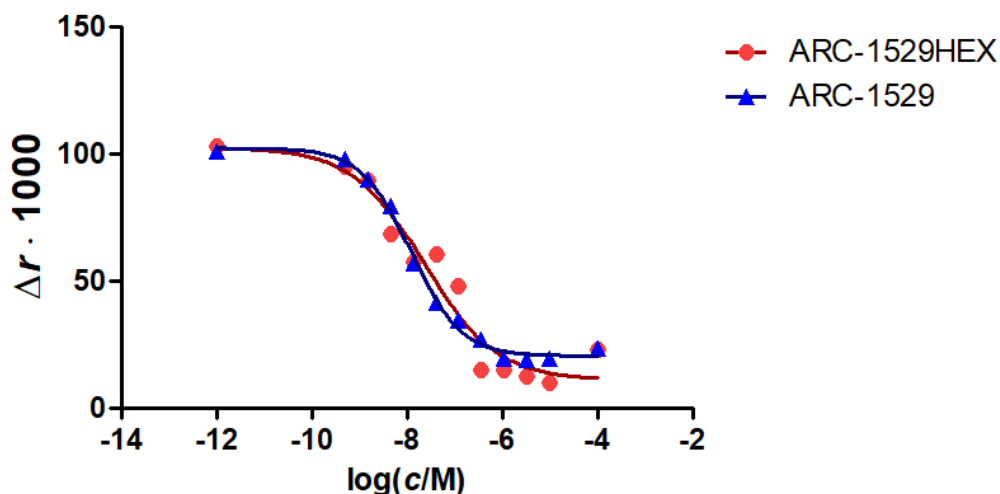
ARC-1502HEX mõõtmine ARC-784-ga

Väljatõrjumise katsete jooksul mõõdeti PHERAstar-iga fluorestsentsanisotroopiat, fluorestsentspolarisatsiooni, intensiivsust ja TGLI-d.

Ilmnes, et selles katses kasutatud ARC-784 sond on liiga tugev meie ainete jaoks ehk nad ei suuda seda ka suurematel kontsentratsioonidel välja tõrjuda, kuigi sondi kontsentratsioon oli ainult 0,75 nM. Seega saadud andmete põhjal ei saanud teha mõistlikku analüüsi. Probleemi lahendamiseks tehti nende ainetega edasised väljatõrjumise katsed ARC-1504-ga.

ARC-1529HEX mõõtmine ARC-1504-ga

Väljatõrjumise katsete jooksul mõõdeti PHERAstar-iga fluorestsentsanisotroopiat, fluorestsentspolarisatsiooni ja intensiivsust. Anisotroopia tulemused on järgmised:



Joonis 15. ARC-1529HEX ja ARC-1529 väljatõrjumise kõver kasutades fluorestsentsanisotroopiat. Ainete inkubatsiooni aeg 37°C juures oli 30 minutit. Ainete IC₅₀-d on:

Aine	IC ₅₀
ARC-1529HEX	23 nM (95% usaldusintervall on 5,7 nM ja 46 nM vahel)
ARC-1529	12 nM (95% usaldusintervall on 9,1 nM ja 17 nM vahel.)

Kuigi IC_{50} -väärtused ARC-1529HEX-il ja ARC-1529-il veidi erinevad, ei ole nende erinevus statistiliselt oluline, mis on näha ka graafikult vaadates. Seega selle lisarühma panemine afiinust ei muutnud. Seega ka selle rühma puhul ei saa eeldada soodsate interaktsioonide teket lisasidumistaskuga. Samas kuna afiinus ka oluliselt ei vähenenud, siis sidumist see rühm ka ei takistanud.

3.3 Järeldused

Kõikki selles töös disainitud ühendeid õnnestus soovitud kogustes sünteesida. Kuigi edasisteks katseteks olid saadud ainete hulgad piisavad, siis sünteeside saagiseid saaks tõsta kasutades näiteks tahke faasi sünteesi algusest lõpuni. Hetkel kasutati vedelfaasi ja tahke faasi protseduuride kombineerimist, et muuta protsess paindlikumaks. Võttes arvesse väljatõrjumiskatsete tulemused, saab väita, et tõenäoliselt kasutatud lisarühmad lisataskusse efektiivselt ei sidunud. Potentsiaalselt saaks valmistada veel teisi ühendeid, et seda võimalust testida. Samuti võib olla, et lisasidumistasku on kristalliseerimise artefakt ja sinna seostuvaid häid ligande polegi võimalik arendada, kuid käesoleval hetkel on andmeid veel üpris vähe, et teha lõplikke järeldusi.

4. KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli sünteesida olemasolevatest ARC-tüüpi inhibiitoritest modifitseeritud versioone, millele on lisatud hüdrofoobseid rühmasid (v.a. PEG rühm – see on hüdrofiilne, aga teistele rühmadele sarnaselt lineaarne). Sünteesiti kolm modifitseeritud ARC-tüüpi inhibiitorit: ARC-1502PEG, ARC-1502HEX ja ARC-1529HEX. ARC-1502PEG ja ARC-1502HEX sünteesiti olemasolevast ARC-1502-st, aga ARC-1529HEX sünteesi jaoks valmistati ARC-1529, kasutades tahke faasi peptiidsünteesi. Peptiidsünteesi alustati Fmoc-D-lys(Boc) Wang *resin*-iga, ja paljude etapide pärast saadi ARC-1529. Sünteesitud ainetega saagised olid piisavad edasisteks uuringuteks.

Edasi uuriti sünteesitud ARC-de sidumisomadusi proteiinkinaasiga CK2 kasutades väljatõrjumiskatseteid. Tuli välja, et NH-PEG(6)-COOH rühma lisamine ARC-1502 juurde vähendab selle afiinsust veidi ning oluliselt vähem kui ARC-1496 koostises olev 12-hüdroksüdodekaanhape. Heks-5-üünhape lisades ARC-1529 juurde ilmnes, et see töötab paremini kui NH-PEG(6)-COOH rühm, heks-5-üünhape lisamine ei mõjuta afiinsust statistiliselt olulisel määral eristumaks originaalsest ARC-1529-st

Töös sünteesitud ained ja nendega tehtud mõõtmised andsid andmeid, mida saab kasutada teiste uute ainete disainimisel. Sünteesitud ainete afiinsuste sõltuvus struktuurist võimaldab tulevikus leida parima rühma ARC-tüüpi inhibiitoritele lisamiseks, selleks et tõsta nende afiinsusi.

The development of CK2 inhibitors

Jaroslav Ivanov

5. SUMMARY

The purpose of this Bachelor's thesis was to synthesize modified versions of existing ARC-type inhibitors with the addition of hydrophobic groups (except PEG group - it is hydrophilic and linear). Three modified ARC-type inhibitors were synthesized: ARC-1502PEG, ARC-1502HEX and ARC-1529HEX. ARC-1502PEG and ARC-1502HEX were synthesized from the existing ARC-1502, while ARC-1529HEX was synthesized from ARC-1529, which in turn was synthesized using solid phase peptide synthesis (SPPS). Peptide synthesis was initiated with Fmoc-D-lys (Boc) Wang resin and after many steps ARC-1529 was obtained. The yields of synthesized substances were sufficient for further studies.

The binding properties of the synthesized ARCs to protein kinase CK2 were further studied by means of displacement experiments. It appeared that the addition of the NH₂-PEG(6)-COOH group to ARC-1502 reduces its affinity slightly and significantly less than the 12-hydroxydodecanoic acid in ARC-1496. The addition of 5-hexynoic acid to ARC-1529 showed that it works better than the NH-PEG(6)-COOH group, although the addition of 5-hexynoic acid in terms of affinity did not improve affinity compared to the original ARC-1529.

The substances synthesized in the work made it possible to carry out useful measurements and to use acquired data in the future design of other new substances. The dependence of the affinity of synthesized substances on the structure will make it possible in the future to find the best group for addition to ARC-type inhibitors in order to increase their affinity.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Kersti Nisuma (2011). Mitme määrgisega ARC-tüüpi inhibiitorite süntees ja iseloomustamine, Tartu Ülikooli keemia instituut, 4–29.
2. Jürgen Vahter (2014). Synthesis of high affinity inhibitors for protein kinase CK2, Tartu Ülikooli keemia instituut, 4–31.
3. G. Cozza, L.A. Pinna, S. Morro (2013). Kinase CK2 Inhibition: An Update, *Current Medicinal Chemistry*, 2013, 20, 671–693.
4. M. Salvi, C. Borgo, L.A. Pinna, M. Ruzzene (2021). Targeting CK2 in cancer: a valuable strategy or a waste of time?, *Cell Death Discovery*, 1–4.
5. X. Chen, C. Li, D. Wang, Yu Chen, Na Zhang (2020). Recent Advances in the Discovery of CK2 Allosteric Inhibitors: From Traditional Screening to Structure-Based Design, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1–8.
6. E.L. Atkinson, J. Iegre, P.D. Brear, E.A. Zhabina, M. Hyvönen, D.R. Spring (2021). Downfalls of Chemical Probes Acting at the Kinase ATP-Site: CK2 as a Case Study, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1–19.
7. G. Cozza (2017). The Development of CK2 Inhibitors: From Traditional Pharmacology to in Silico Rational Drug Design, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1–18.
8. M.A. Bogoyevitch, R.K. Barr, A.J. Ketterman (2005). Peptide inhibitors of protein kinases-discovery, characterisation and use, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1754, 79–99.
9. A.P. Kornev, S. S. Taylor (2010). Defining the conserved internal architecture of a protein kinase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 440–444.
10. S.S. Taylor, C. Kim, C.Y. Cheng, S. H. J. Brown, J. Wu, N. Kannan (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: Diverse strategies for drug design, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784, 16–26.
11. A. R. de Boer, H. Lingeman, Wilfred M.A. Niessen, H. Irth (2007). Mass spectrometry-based biochemical assays for enzymeinhibitor screening, *Trends in Analytical Chemistry*, 9, 867–883.
12. L.A. Pinna, Patricia T.W Cohen (2004). Inhibitors of Protein Kinases and Protein Phosphates.

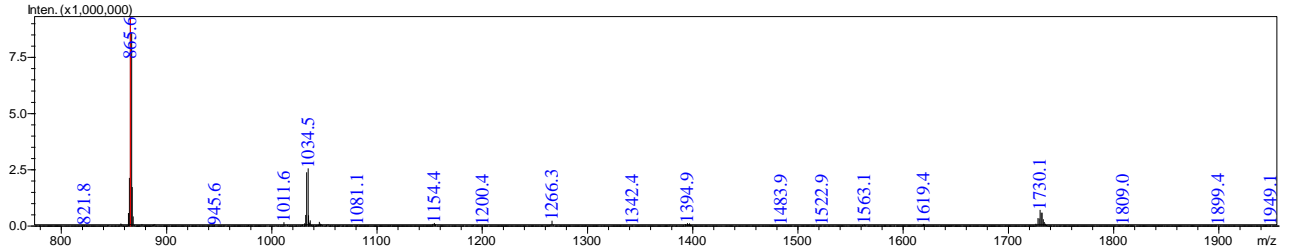
13. Asko Uri, Marje Lust, Angela Vaasa, Darja Lavogina, Kaido Viht, Erki Enkvist (2010). Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 541–546.
14. Darja Lavogina, Erki Enkvist, Asko Uri (2010). Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications, *ChemMedChem*, 5, 23–34.
15. Luppman S., Gumhold, C., Ampofo, E., Montenarh, M., Rother, K. (2013) CK2 kinase activity but not its binding to CK2 promoter regions implicated in the regulation of CK2 α and CK2 β gene expression, *Mol Cell Biochem*, 384, 71–82
16. Enkvist, E., Viht, K., Bischoff, N., Vahter, J., Saaver, S., Raidaru, G., Issinger, O.-G., Niefind, K., Uri, A. (2012) A submolar fluorescent probe of protein kinase CK2 interaction studies *Org. Biomol. Chem.*, 10, 8645–8653
17. Chan W.C., White P.D. (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press press, Oxford
18. Atherton, E., Sheppard, R. C. (1989) *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*, IRL Press, Oxford
19. Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York.
20. Cheng, Y., Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol*, 22, 3099–3108.
21. Werner, C., Lindenblatt, D., Viht, K., Uri, A., Niefind, K. (2023) Discovery and exploration of protein kinase CK2 binding sites using CK2 α ^{rCys336Ser} as an exquisite crystallographic tool, *Kinases Phosphatases*, 4, 306–322.
22. Enkvist, E., Kriisa, M., Roben, M., Kadak, G., Raidaru, G., Uri, A. (2009) Effect of the structure of adenosine mimic of bisubstrate-analog inhibitors on their activity towards basophilic protein kinases, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 19, 6098–6101.
23. Bruce Merrifield (1993) Life during a golden age of peptide chemistry, 54–57
24. Nevin, A., Cesaratto, A., Bellei S., D'andrea, C., Toniolo, L., Valentini, G., Comelli, D. (2014) Time-resolved photoluminescence spectroscopy and imaging: new approaches to the analysis of cultural heritage and its degradation, *Center for Nano Science and Technology*, 14, 6338–6355

25. Legre, J., Atkinson, L.A., Brear, P.D., Cooper, M.B., Huvonen, M., Spring, D.R.
(2021) Chemical probes targeting the kinase CK2: a journey outside the catalytic box, *Org. Biomol. Chem.*, 19, 4380-4396
26. E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, M. Kriisa, T. Ivan, K. Ligi, G. Raidaru, and A. Uri,
(2011) Protein Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes pp. 1052–1062
27. Viht, K., Saaver, S., Vahter, J., Enkvist, E., Lavogina, D., Sinijärvi, H., Raidaru, G., Guerra, B., Issinger O.G., Uri, A. (2015) Acetoxymethyl ester of tetrabromobenzimidazole-peptoid conjugate for inhibition of protein kinase CK2 in living cells, *Bioconjugate chemistry*, vol 26, issue 12
28. Rahnel, H., Viht, K., Lavogina, D., Mazina, O., Haljasorg, T., Enkvist, E., Uri, A.
(2017) A selective biligand inhibitor of CK2 increases Caspase-3 activity in cancer cells and inhibits platelet aggregation, *ChemMedChem*, vol 12, issue 20

LISAD

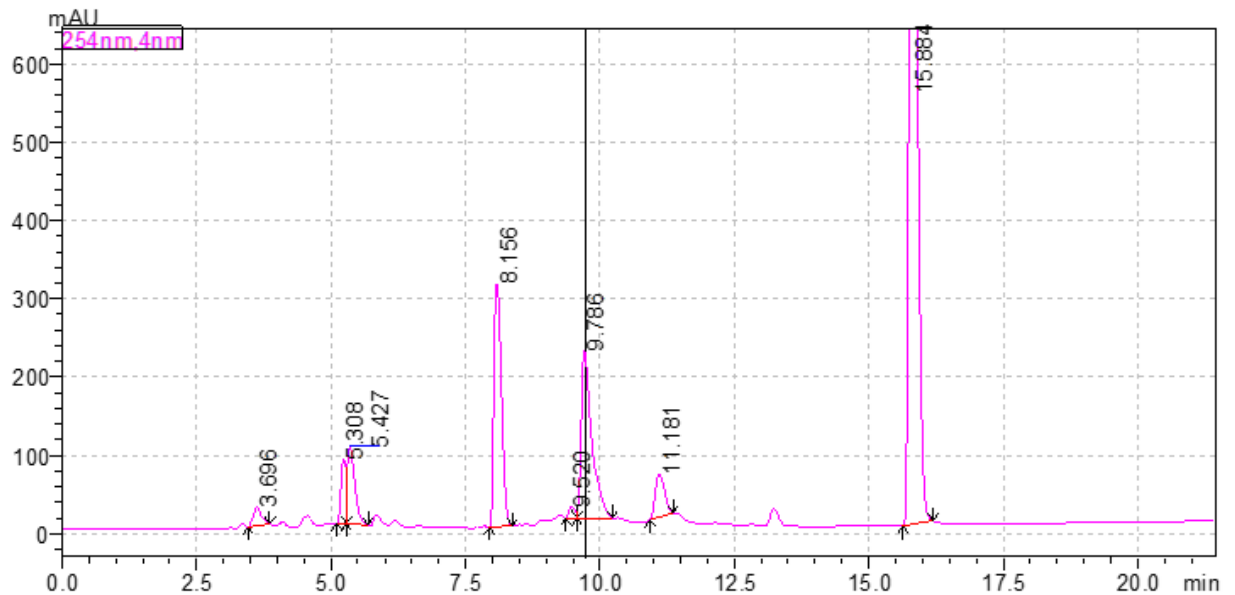
Lisa 1. ARC-1502PEG UV-spekter

Lisa 2. ARC-1502PEG mass-spektrogramm

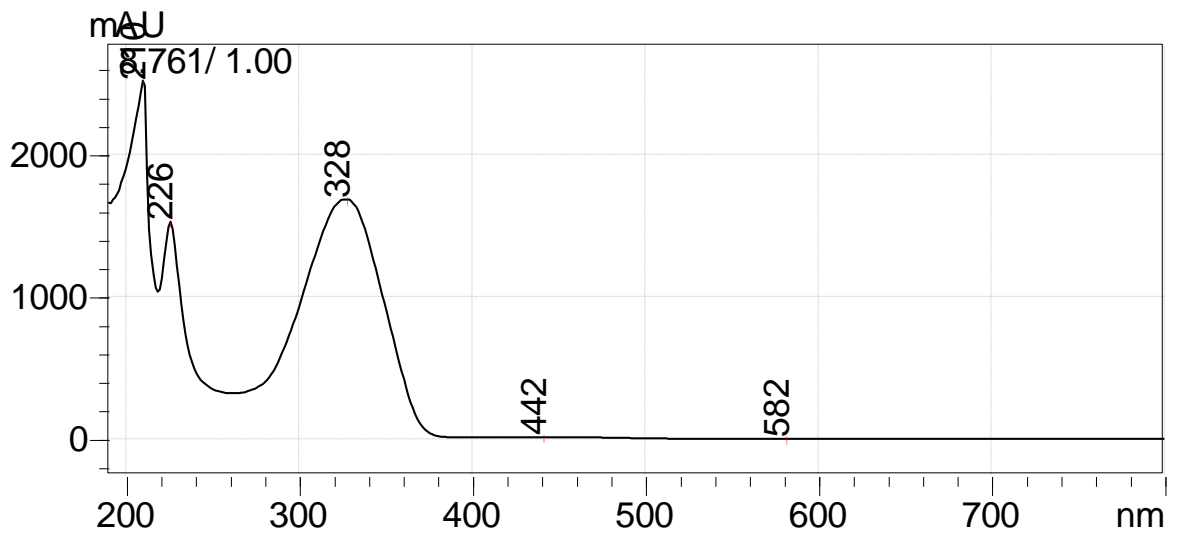


ARC-1502PEG – $C_{60}H_{87}Br_4N_{11}O_{28}$; Molaarmass – 1730 g/mol

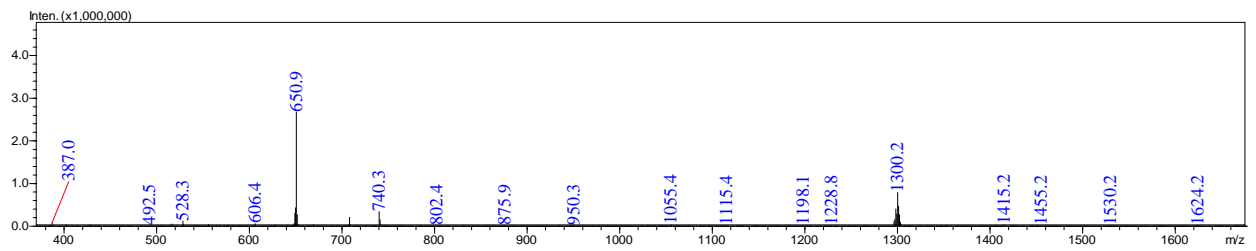
Lisa 3. ARC-1502PEG kromatogramm



Lisa 4. ARC-1529 UV-spekter

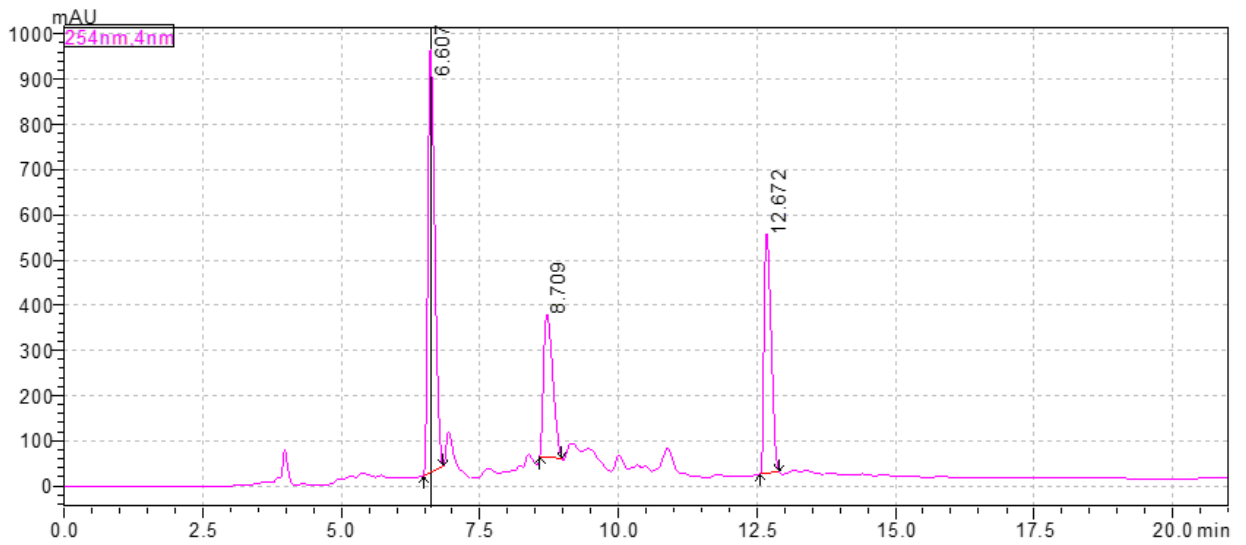


Lisa 5. ARC-1529 mass-spekter

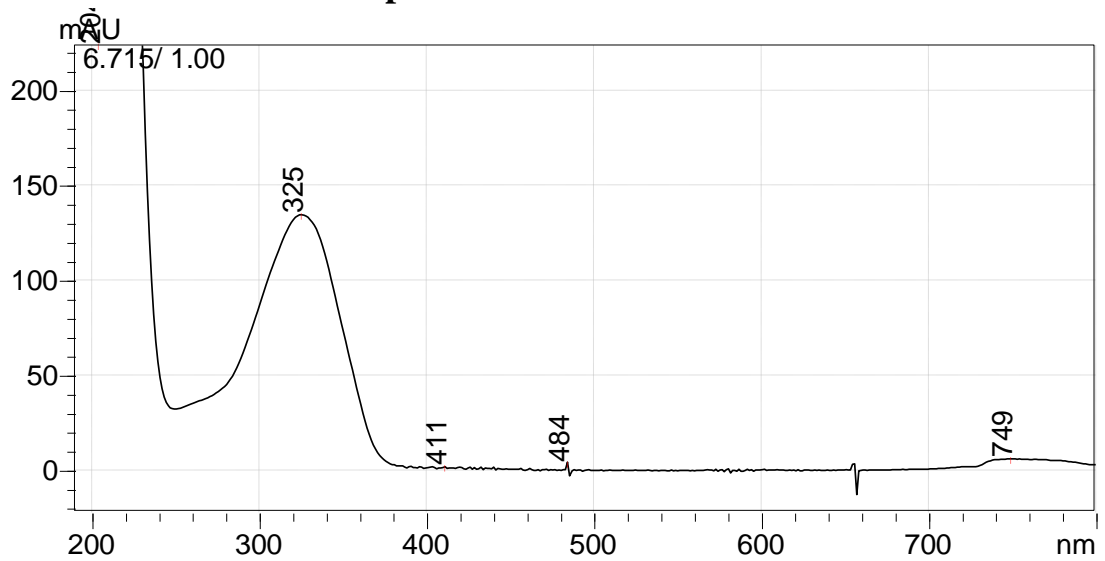


ARC-1529 – C₅₀H₆₅N₁₁O₂₅Se ; Molekulaarmass – 1299 g/mol

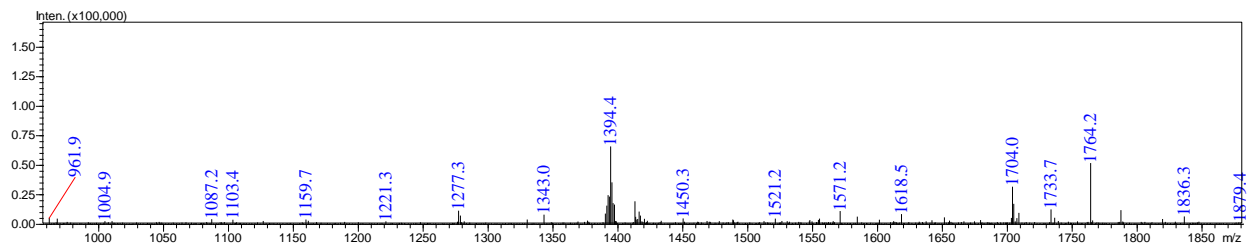
Lisa 6. ARC-1529 kromatogramm



Lisa 7. ARC-1529HEX UV-spekter

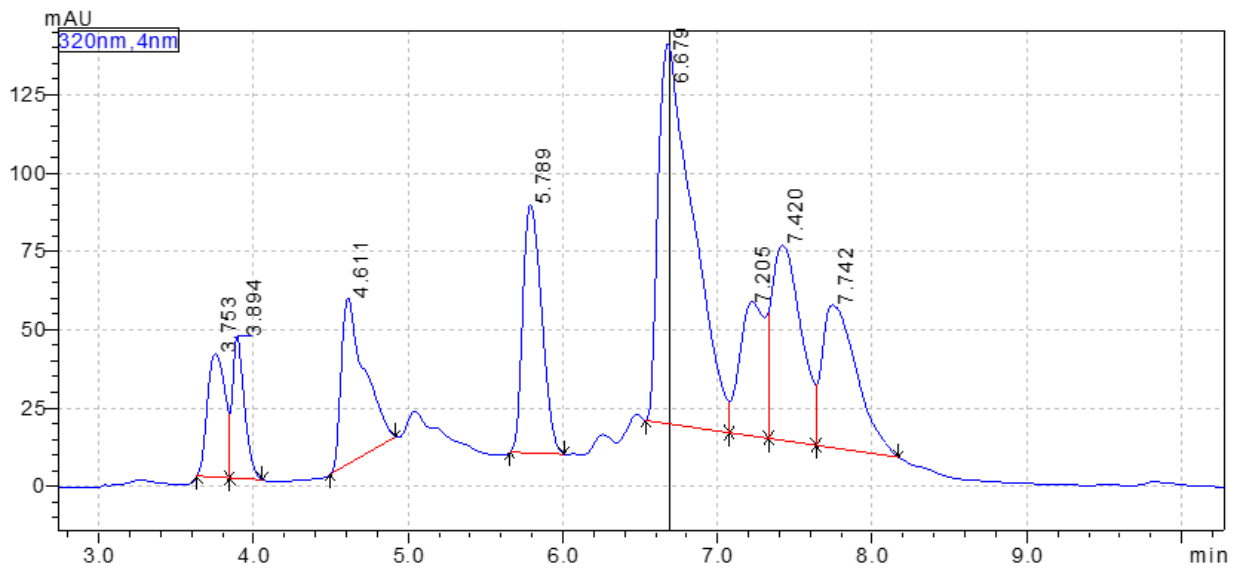


Lisa 8. ARC-1529HEX mass-spekter



ARC-1529HEX – $C_{57}H_{71}N_{11}O_{26}Se$; Molekulaarmass – 1393 g/mol

Lisa 9. ARC-1529HEX kromatogramm



Lisa 10. ARC-1529HEX ja ARC-1529 väljatõrjumise katse fluorestsentsanisotroopia andmed

Aine	ARC-1529HEX	ARC-1529
log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)		
Best-fit values		
Bottom	11,06	20,56
Top	102,5	102,3
LogIC50	-7,632	-7,908
HillSlope	-0,574	-0,8367
IC50	2,331E-08	1,236E-08
Span	91,42	81,73
Std. Error		
Bottom	7,108	1,382
Top	8,764	2,238
LogIC50	0,267	0,05811
HillSlope	0,1781	0,07905
Span	12,66	2,841
95% Confidence Intervals		
Bottom	-5,328 to 27,45	17,38 to 23,75
Top	82,27 to 122,7	97,13 to 107,5
LogIC50	-8,248 to -7,017	-8,042 to -7,774
HillSlope	-0,9846 to -0,1634	-1,019 to -0,6544
IC50	5,648e-009 to 9,620e-008	9,082e-009 to 1,683e-008
Span	62,22 to 120,6	75,18 to 88,28
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	8	8
R square	0,9476	0,9954
Absolute Sum of Squares	686,3	53,74
Sy.x	9,262	2,592
Number of points		
Analyzed	12	12

**Lisa 11. ARC-1502PEG, ARC-1502 ja ARC-1496 väljatõrjumise katse
TGLI andmed**

Ained	ARC-1502PEG	ARC-1502	ARC-1496
log(inhibitor) vs. response			
Best-fit values			
Bottom	747,1	405,1	-96,13
Top	11970	11726	11817
LogIC50	-6,835	-7,317	-6,19
IC50	1,464E-07	4,823E-08	6,457E-07
Span	11223	11321	11913
Std. Error			
Bottom	887,2	296	316,1
Top	747,1	324,4	182,3
LogIC50	0,2092	0,079	0,05732
Span	1090	412,6	344,8
95% Confidence Intervals			
Bottom	-1260 to 2754	-264,5 to 1075	-811,1 to 618,8
Top	10280 to 13660	10993 to 12460	11404 to 12229
LogIC50	-7,308 to -6,361	-7,495 to -7,138	-6,320 to -6,060
IC50	4,923e-008 to 4,352e-007	3,196e-008 to 7,278e-008	4,791e-007 to 8,704e-007
Span	8758 to 13688	10388 to 12255	11133 to 12693
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	9	9	9
R square	0,9227	0,9882	0,9934
Absolute Sum of Squares	21760000	3185000	1689000
Sy.x	1555	594,9	433,2
Number of points			
Analyzed	12	12	12

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, ___Jaroslav Ivanov_____,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

_____CK2 inhibiitorite arendus _____,

mille juhendaja on _____Erki Enkvist_____,

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

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

Jaroslav Ivanov

26.05.2025