

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Kaijus Janis

**Tiasooli tsüklit sisaldavate bisubstraatsete proteiinkinaasi CK2
inhibiitorite arendamine**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendaja: Kaido Viht, PhD

Tartu 2020

Infoleht

Proteiinkinaas CK2 on pleiotroopne ensüüm, mis mängib olulist rolli paljudes bioloogilistes protsessides, aga on seotud ka mitmete haigustega, näiteks vähkkasvajatega. Ühtlasi on täheldatud, et kasvajak on CK2 pidevast aktiivsusest sõltuvuses. Liigaktiivsete proteiinkinaaside pärssimiseks on vaja leida inhibiitoreid, mis pidurdavad ensüümide aktiivsust. CK2 inhibeerimise tulemusena on nähtud angiogeneesi pidurdumist ning vähirakkude apoptoosi.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kuidas tiasooli tuuma sisaldavate bisubstraatsete inhibiitorite võime seonduda proteiinkinaasiga CK2 sõltub inhibiitori struktuuris oleva hüdrofoobse vahelüli ning karboksüülühmi sisaldava peptoidahela pikkusest. Sarnaselt varasemalt publitseeritud andmetega nähti nii vahelüli kui ka peptoidahela pikendamisel afiinsuse kasvu.

Märksõnad: ensümolooogia, inhibiitorid, proteiinkinaas CK2, keemiline süntees

Development of thiazole ring-comprising bisubstrate inhibitors of protein kinase CK2

Protein kinase CK2 is an pleiotropic that plays an essential role in many key biological processes which are also crucial for the survival of cancer cells. Moreover, cancer cells have shown to be addicted towards CK2 due to its constant activity. This has emphasized the need to develop inhibitors which are capable of downregulating the enzyme. The downregulation of CK2 has been shown to suppress angiogenesis and induce apoptosis.

The aim of this present work was to develop a potent bisubstrate inhibitor by varying the length of the linker which connects the two CK2-interacting structural fragments and by the examination of change in affinity when varying the length of the peptoid chain. As previously reported, increase in affinity was observed. An approximate 2-fold increase in affinity was observed per two additional links in the linking fragment and an approximate 3-fold increase in affinity was observed per three additional residues in the peptoid chain.

Keywords: enzymology, inhibitors, protein kinase CK2, chemical synthesis

Kasutatud lühendid

2-CTC – 2-klorotritüülkloriid

ACN - atsetonitril

ARC – adensiini analoogi ja peptiidi või peptiidanalooži konjugaat

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

ATB - 4-(2-amino-1,3-tiasool-5-üül)bensoehape

ATP – adensiin-5'-trifosfaat

Boc – *tert*-butüüloksükarbonüülrühm

CK2 – kaseiinkinaas 2

DCM - diklormetaan

DIC – *N,N'*-diisopropüülkarbodiimid

DIPEA – *N,N*-diisopropüületüülamin

DNA - desoksüribonukleiinhape

DTT - ditiotreitool, (2*S*,3*S*)-1,4-bis(sulfanüül)butaan-2,3-diol

EM – emissioonifilter

ESI – elektropihustusionisatsiooni

EX - ergastusfilter

FA - fluorestsentsanisotroopia

Fmoc - 9-fluorenüülmetoksükarbonüül

HBTU - *O*-(bensotriasool-1-üül)-*N,N,N',N'*-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat

HEPES - 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HFIP - heksafluoroisopropanool

HOBt - 1-hüdroksübensotriasool

IC₅₀ - aine kontsentratsioon, mis inhibeerib 50% algsest aktiivsusest

iPrOH - isopropanool

LC – vedelikkromatograafia

MeOH - metanool

MS - massispektromeetria

NMM - *N*-metüülmorfoliin

PG – kaitserühm

TES - trietüülsilaan

TFA - trifluoroetaanhape

TGL – aeglahutusega luminesentsi mõõterežiim

Sisukord

1.	Teema olulisus ja eesmärk.....	6
2.	Kirjanduse ülevaade.....	7
2.1.	Proteiinkinaasid.....	7
2.2.	Proteiinkinaas CK2	7
2.3.	Proteiinkinaas CK2 inhibiitorid	9
2.4.	ARC-tüüpi proteiinkinaas CK2 inhibiitorid.....	10
2.5.	Fotoluminestsents.....	11
2.6.	Aegviivitusega luminesentsi mõõtmine	13
2.7.	Tahkefaasisüntees ja peptoidisüntees.....	14
3.	Eksperimentaalne osa	17
3.1.	Kasutatud kemikaalid.....	17
3.2.	Aparatuur ja töövahendid.....	17
3.3.	Sünteesi eeskirjad.....	18
3.3.1.	Peptoidisüntees tahkel faasil: Fmoc-[Ipa(tBu)] ₃ süntees	18
3.3.2.	ARC-800 – ARC-804 süntees	18
3.3.3.	ARC-805 – ARC-808 süntees	19
3.4.	Aktiivse proteiinkinaas CK2 α kontsentratsiooni määramine	20
3.5.	Ühendite proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine	20
4.	Tulemused ja arutelu.....	22
5.	Kokkuvõte.....	29
6.	Summary	30
7.	Kasutatud kirjandus	31
8.	Lisad	34

1. Teema olulisus ja eesmärk

Proteiinkinaasid katalüüsivad fosforüülrühma ülekannet ATP-lt substraatvalgule, mille tulemusena aktiveeritakse valg. Proteiinkinaasid reguleerivad rakkude paljunemist, elutsükli ja elujõulisust. Liigaktiivseid proteiinkinaase on seostatud mitmete haigustega, sealhulgas vähiga. Liigaktiivsuse pärssimiseks on vaja leida ühendeid ehk inhibiitoreid, mis suudavad pidurdada proteiinkinaase. Seetõttu on proteiinkinaasid kujunenud ravimiarenduses oluliseks sihtmärgiks [1–3].

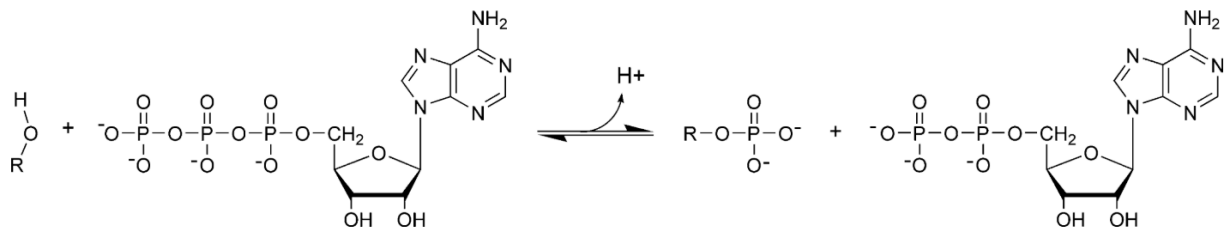
Erinevates vähitüüpides on proteiinkinaas CK2 üleekspressioneeritud. Vähirakud on liigaktiivse proteiinkinaas CK2 tõttu elujõulised, sest ensüüm soodustab angiogeneesi. CK2 inhibeerimise tulemusena on nähtud angiogeneesi pidurdumist ning apoptoosi vähirakkudes [2,4]. Peamiselt on arendatud ATP-ga konkureerivad inhibiitorid, kuid kõik kinaasid seovad ATP-d, mistõttu on inhibiitorite selektiivsus sihtkinaasi vastu halb [5]. Samuti pole valksubstraadiga konkureerivate inhibiitorite arendust saanud edu, sest CK2 on atsidofiilne kinaas ehk tunneb ära negatiivse laenguga substraadid, st laenguga valgul on plasmamembraani läbitavus inhibiitoril on kehv [5]. Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas on välja töötatud bisubstraatsed inhibiitorid, mis korruga seostuvad nii ATP kui ka substraatvalgu taskusse proteiinkinaasi aktiivtsentris. Bisubstraatsed CK2 inhibiitorid koosnevad nukleosiidi mimikeerivast fragmendist ning füsioloogilises keskkonnas negatiivselt laetud peptiidist või peptiidanaloozist. Kahte kinaasiga interakteeruvat fragmenti ühendab alifaatne vahelüli. Uuringutes [5] on nähtud, et bisubstraatsed inhibiitorid on kinaaside vastu selektiivsemad ja võimekama inhibeerimisvõimega kui monosubstraatsed inhibiitorid.

Töö eesmärk on arendada kõrge afiinsusega bisubstraatne inhibiitor vahelüli ning peptoidahela pikkuse konjugeerimise teel. Valksubstraadi mimikeerijana peptoidahela kasutamise eelis peptoidahela ees on stabiilsus proteolüütilise lagunemise ees ning peptoidlülil kõrvalahelas asetseva karboksüülrühma esterdamine muudab inhibiitori hüdrofoobseks ning plasmamembraani läbivaks[6].

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Proteiinkinaasid

Inimgenoomis on klassifitseeritud erinevatel andmetel 518 kuni 538 proteiinkinaase kodeerivat geeni, mis moodustab pea 2% kogu inimgenoomist [1,7]. Proteiinkinaasid on ensüümid, mis reguleerivad valkude bioloogilist aktiivsust, katalüüsides γ -fosforüülrühma ülekannet adeniin-5'-trifosfaadilt substraatvalgu seriini, treoniini või türosiini jäägi hüdroksüülrühmale [1]. Proteiinkinaase jaotatakse aminohappe jäägi fosforüleerumise järgi seriini/treoniini ja türosiini kinaasideks [8]. Valkudele fosforüülrühma lisamist kutsutakse fosforüülimiseks (Joonis 1). Fosforüülimise tulemusena kutsutakse esile valgu konformatsiooniline muutus kas inaktiivsest olekust aktiivsesse olekusse või vastupidi [9].



Joonis 1. Fosforüülrühma ülekanne ATP-lt valksubstraadi hüdroksüülrühmale [1].

Valkude aktiivsuse mõjutamise tulemusena kontrollivad proteiinkinaasid mitmeid rakuprotsesse, näiteks metabolismi, geenide transkriptsiooni, raku paljunemist, liikumist ja ellujäämist ning apoptoosi. Samuti on proteiinkinaasidel oluline roll rakkudevahelisel suhtlusel raku jagunemistsükli, füsioloogilistes vastustes, homöostaasis ning närvi- ja immuunsüsteemi funktsioneerimisel [7,8].

Proteiinkinaaside olulise rolli tõttu raku elutsükli on nende regulatsioonihäiretega seotud üle 400 haiguse (sh vähk, diabeet, HIV, Alzheimer, kõrgvererõhutõbi) [10]. Sellest tulenevalt on proteiinkinaasid suuruselt teine ravimiarenduse sihtmärk, esikohal on G-valguga seotud retseptorid [11].

2.2. Proteiinkinaas CK2

Proteiinkinaas CK2 (vanema nimetusega kaseiinkinaas 2) on üldlevinud ning pleiotroopne ensüüm ehk kinaas suudab fosforüülda mitmeid erinevaid substraate. CK2 on kõrgelt konserveerunud järjestusega, st kinaasil on sarnased või identsed aminohappelised järjestused organismide eri liikidel. CK2 võib organismis esineda kas monomeerse kinaasina või tetrameerse kompleksina, kus

on kaks katalüütilist alaühikut (CK2 α või CK2 α') ning kaks regulaatorset alaühikut (CK2 β) [12]. Erinevalt teistest proteiinkinaasidest on ensüüm pidevalt aktiivne. CK2 katalüütilised alaühikud jäävad aktiivseks olenemata regulaatorse alaühiku olemasolust, β -alaühik moduleerib ensüümi spetsiifilisust ning stabiilsust [5]. Sarnaselt teistele proteiinkinaasidele katalüüsib CK2 fosforüülühma ülekannet seriini ja treoniini jääkidele, kuid erineb teistest kinaasidest võimega fosforüülida ka türosiini [5,13]. Proteiinkinaas CK2 on atsidoofiilne kinaas, mis tunneb ära negatiivselt laetud aminohappeid sisaldavaid substraate. Ensüümi poolt äratuntav valksubstraadi konsensusjärjestus on :

(E/D/x)-(S/T/Y)-(E/D/x')-(E/D)-(E/D/x),

kus S/T/Y on fosforüülühma aktseptor, x ja x' on positiivse laenguta aminohappe jääk, millest x' välistab proliini. Tähtsaim happeline aminohappe jääk on n+3 asendis, mida leidub pea 90% uuritud CK2 valksubstraatide sidumistaskutes. Tähtsuselt teisel kohal on n+1 asendis olev negatiivselt laetud aminohappejääk, mida leidub 75% sidumistaskutes. Juhul, kui n+3 asendis puudub happeline aminohappejääk, siis leidub see n+1 asendis ja vastupidi. Asendite n-1 ja n+4 vahel asetsevad aluselised aminohappejäägid väga harva, sest positiivsed laengud nendel positsioonidel takistavad sidumist [14].

Aastal 2003 avaldati kirjanduses, et CK2 substraatide arv oli 307, millest kolmandik on seotud geeniekspressiooniga ning valgusünteesiga [12]. Aastaks 2016 oli CK2 substraatide arv tõusnud pea 400-ni [15]. Proteiinkinaas CK2 mängib olulist rolli mitmetes peamistes bioloogilistes protsessides, mis on seotud kasvajatega. Protsesside hulka kuuluvad raku kasvu ja paljunemise reguleerimine, geeniekspressioon ning apoptoos [12]. Samuti on CK2-1 oluline roll raku toimetulekul DNA kahjustuse korral [2,5,13]. Umbes kolmandik CK2 substraate annavad oma panuse geeniekspressiooni ning valgusünteesi. Paljud substraadid ka on seotud signaalradadega, mis on viiruste elutsükliks hädavajalikud [12].

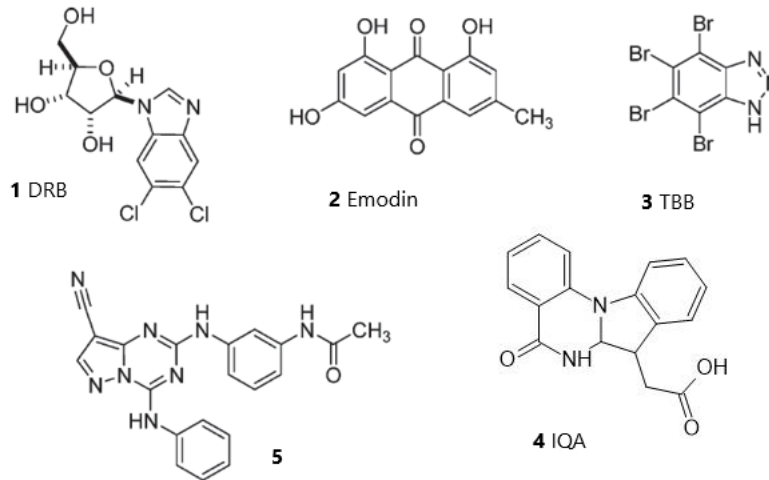
CK2 liigaktiivsust seostatakse neurotaandarenguga, tromboosiga, multipleksskleroosiga, kuid peamiselt vähiga. Samuti on leitud, et vähirakkudes on proteiinkinaas CK2 üleekspressioneeritud [4,13]. Uuringud on näidanud, et kasvajakasv on proteiinkinaasi CK2 pidevast aktiivsusest sõltuvuses, mis tõstab ensüümi liigaktiivsuse pärssimisvõimaluste leidmise tähtsate kohale ravimiarenduses [15]. CK2 soodustab vähirakkude kiiret levikut ja kasvu, elujõulisust ning angiogeneesi. Ensüümi

inhibeerimise tulemusena on täheldatud angiogeneesi pidurdumist ning vähirakkude apoptoosi [2,5,12,13].

2.3. Proteiinkinaas CK2 inhibiitorid

Proteiinkinaaside väärtalituse ja liigaktiivsuse reguleerimiseks on vaja leida inhibiitoreid ehk aineid, mis suudavad pidurdada ensüümi aktiivsust. Kinaaside aktiivtsentris on kaks sidumispaika: üks ATP ja teine valksubstraadi jaoks. Paljud välja arendatud inhibiitorid on suunatud ATP sidumistaskusse ehk inhibiitorid konkureerivad ATP-ga. Paraku on ATP-konkurentsete inhibiitorite arendus raskendatud, sest aktiivtsentrite sarnasus sihtkinaasi ja teiste proteiinkinaasidega viib halva selektiivsuseni [1,5].

Varasemalt on kirjanduses avaldatud mitmeid ATP-konkurentseid proteiinkinaas CK2 inhibiitoreid (Joonis 2). DRB (**1**) oli üks esimesi kirjeldatud CK2 inhibiitoreid, IC_{50} väärtusega 15 μM . Sellest võimekama toimega flavonoidil, Emodin (**2**), IC_{50} väärtusega 2 μM puudus spetsiifilisus. Üks enimuurituid inhibiitorite struktuurklasse on polühalogeenitud heteroareenid. TBB (**3**), mis kuulub selle klassi alla, on parema selektiivsuse ning ka võimekusega kui paljud teised tuntud inhibiitorid. Nimetatud struktuurklassi molekule on kasutatud CK2 funktsionaalse rolli uurimises ning on täheldatud ka kõrget tolerantsi hiirte poolt, kuid aromaatsel polühalogeenituse struktuurne omapära tõstatab mure aine toksilisuses inimorganismis. Lisaks on ravimitööstusest läbi käinud ka eelnimetatud inhibiitoritest võimekamad ühendid IQA (**4**) ($IC_{50} = 80$ nM) ning pürasool[1,5-a][1,3,5] triasiinide (**5**) seeria, kus mõningate analoogide K_i väärtused on olnud alla 1nM, kuid mõlema ühendi kohta pole rohkem andmeid publitseeritud. Kõigist eelmainitud inhibiitoritest pole ükski jõudnud kliinilistesse katsetesse [16]. Vähene edu CK2 inhibiitorite arenduses on tingitud ravimitootjate tõrkusest. Üheks põhjuseks on olnud korrelatsiooni puudumine CK2 ja individuaalsete signaalradade vahel, mille talitushäired põhjustaksid kasvaja. Teiseks põhjuseks on olnud kinaasi suur pleiotroopsus. Kardeti, et ensüümi inhibeerimine viib liiga mitmetele tahtmatutele tagajärgedele, mida põhjendati loomade surmaga lootearengus, kui CK2 alaühikud kaotasid aktiivsuse [15].



Joonis 2. Varasemalt arendatud CK2 inhibiitorid.

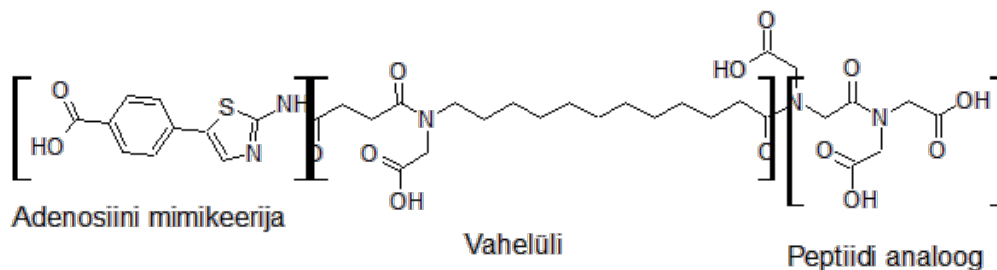
Valksubstraadiga konkureerivad inhibiitorid võiksid ATP-konkurentsete inhibiitorite selektiivsuse probleemi lahendada, kuid CK2 on atsidofiilne kinaas ehk ensüüm nõuab negatiivse laenguga substraati, siis sellisel inhibiitoril rakusisesel kinaasini jõudmisel raskusi, sest plasmamembraani läbimine on kehv [1,5]. Ühtlasi ka pole valksubstraatsed inhibiitorid vastupidavad proteaasidele, mis lagundavad valke [17]. Seniks on kliinilistesse katsetesse jõudnud ainult üks proteiinkinaasi CK2 ATP-ga konkureeriv ning üks valksubstraadiga konkureeriv inhibiitor – CX-4945 ning CIGB-300 vastavalt [2]. Selektiivsuse probleemi aitavad lahendada näiteks bisubstraatsed inhibiitorid, mis seonduvad nii ATP kui valksubstraadi aktiivtsentritega sihtmärk-kinaasi taskus [7].

2.4. ARC-tüüpi proteiinkinaas CK2 inhibiitorid

Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimiskeskuses on välja töötatud bisubstraatsed inhibiitorid – ARC-d (Joonis 3). ARC-d suunatud CK2-le koosnevad nukleosiidi mimikeerivast fragmendist, mis seonduv proteiinkinaasi ATP sidumistaskusse, ning füsioloogilises keskkonnas negatiivselt laetud peptiidist või peptiidi analoogist, mis seob kinaasi pinnale valksubstraadi sidumispäigale. Kahte fragmenti ühendab alifaatne vahelüli (*linker*). ARC-de omapära on, et peptiidi või peptiidanalooži C-terminaali otsa võib kinnitada fluorestseeruva värvi, mis võimaldab inhibiitorit kasutada biosensorina kinaasi kontsentratsiooni määramisel või inhibiitorite dissotsiatsioonikineetika uurimisel, kusjuures fluorestseeruv ühend afiinsust märgatavalt ei mõjuta [18]. Fluorestseeruva värviga konjugeeritud inhibiitorit saab kasutada CK2 kontsentratsiooni määramisel rakulüsaatides ning CK2 inhibiitorite iseloomustamisel

fotoluminestsentsi aeglahutusega mõõtmise teel [2]. Uurimistulemused on näidanud, et ARC-tüüpi inhibiitorid on CK2 suhtes selektiivsemad ja võimekamad kui monosubstraatsed inhibiitorid [5,19]. On ka näidatud, et CK2-selektiivsetel inhibiitoritel ATB ja ASB on kinaasi ATP sidumistaskusse seondumisel toatemperatuuril märkimisväärne fotoluminestsents, kus seondumata vaba inhibiitori signaal on olematu, mis võimaldab saada usaldusväärseid tulemusi väikeste uuritavate ainekogustega. ATB ja ASB konjugeerimisel CK2 valksubstraati mimikeeriva peptiidiga saavutati suurenenud afiinsus CK2 vastu. Kui klassikaliselt uuritakse CK2 aktiivsust ning inhibiitorite toimet radioaktiivselt märgistatud ühenditega, mis nõuab kindlaid ettevaatusabinõusi, siis selenasooli- või tiasoolitsükli sisaldav ARC-inhibiitor muudab tänu intensiivsele luminesentsile ja kõrgele selektiivsusele protsessi lihtsamaks ning ohutumaks [2].

CK2-le suunatud ARC inhibiitoritega on saavutatud stabiilsus proteolüütilise lagunemise vastu ning rakumembraani läbitavusele eelravimi näol. Peptiidiahela vahetamine peptoidahela vastu suurendab stabiilsust ning negatiivselt laetud karboksüülrühmade maskeerimine atsetoksümetüülestriga võimaldab inhibiitoril rakumembraani läbida [6].



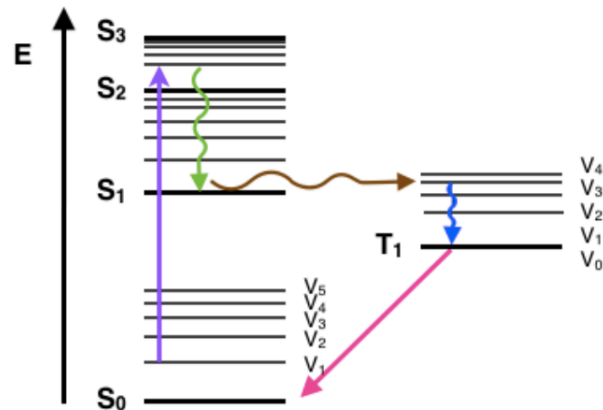
Joonis 3. ARC-796 struktuur.

2.5. Fotoluminestsents

Luminesentsiks nimetatakse protsessi, mille korral viiakse aatomid ergastatud olekusse ning kuna ergastatud olekud on ebastabiilsed, toimub üleminek põhiolekusse, mille käigus neelatud energia vabaneb valguse näol [20].

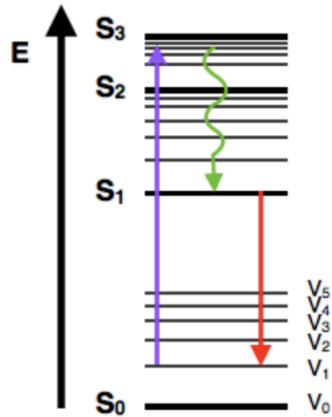
Fotoluminestsentsi põhiliikideks fluorestsents ja fosforestsents. Fotoluminestsentsi korral toimub ergastumine elektromagnetkiirgusega, milleks võib olla UV-kiirgus, röntgenkiirgus või γ -kiirgus. [21].

Valguse neeldumisel ergastatakse põhiolekus (S_0) molekul kõrgematele energiatasemele (S_1, S_2), mille järel toimub sisekonversioon $S_n \rightarrow S_{n-1}$ (Joonis 4). Fosforestsentsi korral toimub süsteemis üleminek ergastatud singletsest olekust ergastatud tripletsesse olekusse $S_{n-1} \rightarrow T_{n-1}$. Seejärel on võimalik üleminek tagasi singletsesse põhiolekusse $T_{n-1} \rightarrow S_0$, mis põhjustab kas valguse kiirgumise fosforestsentsi näol või soojuste eraldumise [22]. Fosforestsentsi korral toimub valguse eksponentsiaalne kustumine 10^{-6} – 10^{-3} s jooksul [21].



Joonis 4. Jablonski diagramm [22]. Võimalik fosforestsentsi diagramm, kus toimub absorptsioon (lilla), sisekonversioon (roheline), süsteemidevaheline üleminek singletsest olekust tripletsesse olekusse (pruun), vibratsiooniline relaksatsioon (sinine) ning fosforestsents (roosa).

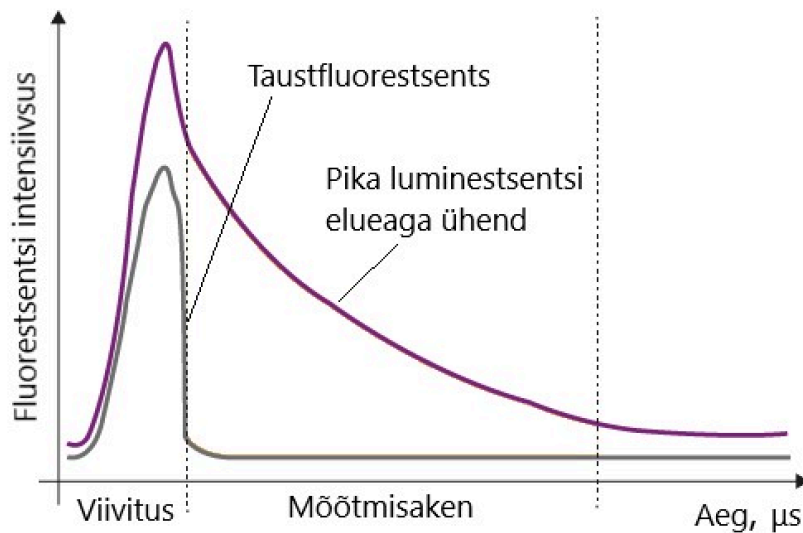
Fluorestsentsi puhul (Joonis 5) toimub fosforestsentsiga sarnane protsess, valguse neeldumisel ergastub molekul kõrgematele vibratsioonilistele energiatasemetele, mille järel toimub sisekonversioon ja vibratsiooniline relakseerumine ning lõpuks fluorestsents. Kiiratud valgus on alati madalama energiaga ning pikema lainepikkusega kui ergastavad footonid, sest energiat kaotatakse sisekonversiooni ja vibratsioonilise relakseerumise käigus [22]. Fluorestsentsi korral toimub eksponentsiaalne kustumine peaaegu koheselt, 10^{-9} – 10^{-7} s jooksul [21].



Joonis 5. Jablonski diagramm [22]. Võimalik fluorestsenti diagramm, kus toimub absorptsioon (lilla), sisekonversioon ja vibratsiooniline relakseerumine (roheline) ning fluorestsents (punane).

2.6. Aegviivitusega luminesentsi mõõtmine

Aegviivitusega luminesentsi (ingl. k *time-gated luminescence*) mõõtmise korral kiiritatakse proovi pulseeriva valgusega ning mõõtmist ei alustata kohe, vaid teatud aja möödudes (Joonis 6). Meetodit rakendatakse, et vähendada taustamüra, mille põhjustajaks on näiteks raku autofluorestsents [23]. Viivitusega mõõtmist saab teostada pika luminesentsi elueaga ühendite korral, mis emiteerivad valgust kauem kui kestab taustast põhjustatud fluorestsents.

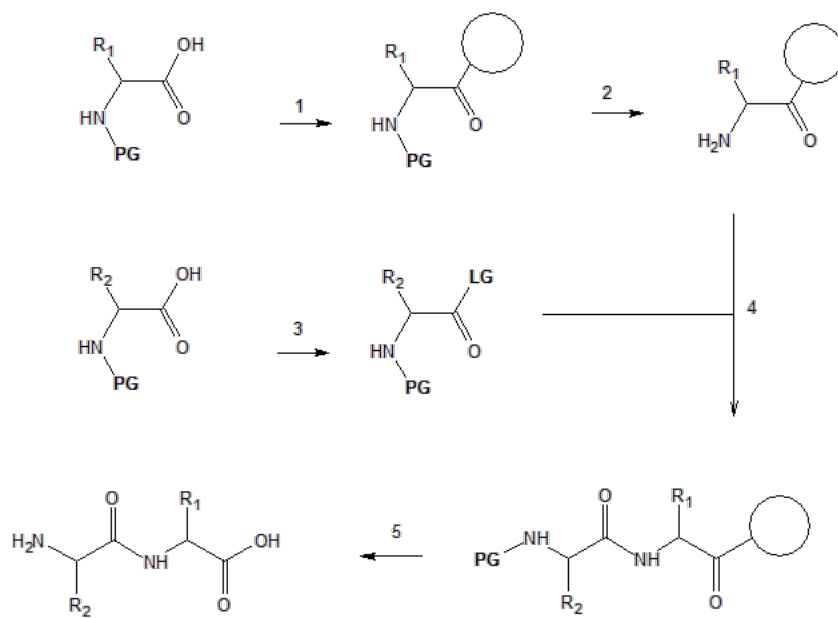


Joonis 6. Aeglahutusega luminesentsi mõõtmise põhimõte [24]. Joonis on esitatud muudetud kujul.

2.7. Tahkefaasisüntees ja peptoidisüntees

Tahkefaasisüntees on enamlevinud peptiidisünteesi meetod. Süntees algab peptiidi C-terminaalse aminohappe kinnitamisega tahkele kandjale, milleks on reaktsioonisegus lahustumatu vaik. Tahkel kandjal on teatud kogus funktsionaalrühmi, millest saavad reaktsioonitsentrid. Tahketel kandjatel on laadung (*loading*, väljendatakse moolides funktsionaalrühmi vaigu massiühiku kohta), mis väljendab funktsionaalrühmade tihedust vaigu pinnal [25,26].

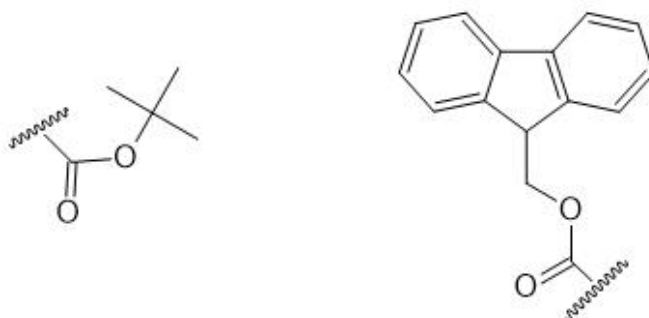
Tahkefaasisüntees on sarnane lahusefaasi-sünteesiga, kuid peamiseks erinevuseks on see, et kasvav järjestus on üht otsapidi (tavaliselt C-terminaali kaudu) seotud tahke kandjaga, mistõttu puudub vajadus C-terminaali kaitsmiseks, kuid iga aminohappe lisamisel tuleb eemaldada kaitserühm lämmastikult, millele uut lüli liidetakse (Skeem 1).



Skeem 1. Peptiidisüntees tahkel kandjal. 1) Aminohappe kinnitamine tahkele kandjale. 2) Kaitserühma **PG** eemaldamine aminohappel. 3) Lisatava aminohappe karboksüülrühma aktiveerimine. 4) Teise aminohappe liitumine. 5) Peptiidi eemaldamine tahkelt kandjalt ning kaitserühmade eemaldamine. Etappe 2 kuni 4 korratakse kuni saavutatakse soovitud peptiidijärjestus.

Lisatava aminohappe kõrvalrühmad seejuures vajavad kaitset, kui kõrvalahelates sisalduvad samad funktsionaalrühmad, mis osalevad põhiahela moodustamisel (amino- ja karboksüülrühmad, sh

tsüsteiin, metioniin ja trüptofaan). N-terminaalsete aminorühmade ja kõrvalahelate kaitserühmad peavad olema ortogonaalsed, st eemaldatavad erinevates tingimustes. Sel juhul ei ole peptiidahela kasvatamisel ohtu reaktsioone kõrvalrühmadega või külghelate kaitse mahatulekut. Enamlevinud N-terminaalsed kaitserühmad on *tert*-butüüloksükarboksüülrühm (Boc) ja fluoroenüülmetüüloksükarbonüülrühm (Fmoc) (Joonis 7). Boc rühm on eemaldatav trifluoroäädikhappega (TFA) ning Fmoc on eemaldatav alusega, milleks on üldiselt 20% piperidiini lahus *N,N*-dimetüülformamiidis. Kuna peptiidsideme teke karboksüülhappest ja primaarsest amiinist on väga kõrge aktivatsioonienergiaga protsess, on karboksüülhappe aktiveerimine vajalik. Aktiveerimise käigus muudetakse lisatava aminohappe karboksüülrühm keemiliselt aktiivsemaks ühendiks – estriks, anhüidriidiks vms. Levinud aktivaatorid on fosfooniumi reagentid, amiiniumi/urooniumi reagentid ja karbodiimiidid. Sünteesi lõpus eemaldatakse peptiid tahkelt kandjalt ehk kliivitakse (ingl k *cleavage*) [25,26].

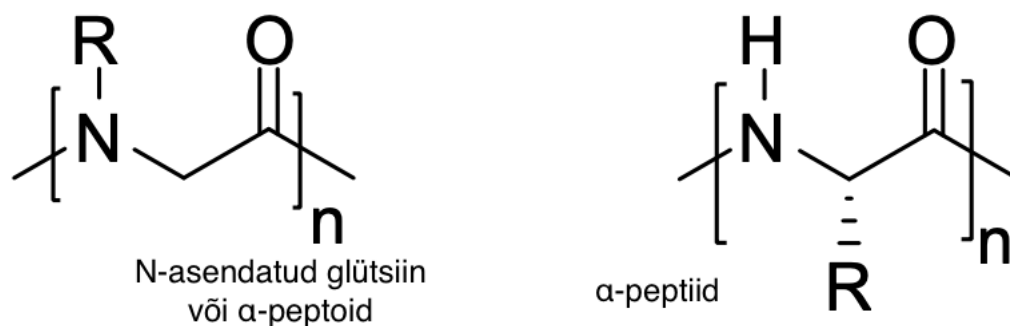


Joonis 7. Boc ja Fmoc kaitserühm

Tahkefaassünteesi eelised vedela faasi sünteesi ees on kiirus, automatiseeritavus ning kerge puhastamisvõimalus vaheetappides. Meetodi üheks puuduseks kui ka eeliseks on suur reagentide kulu, sest aineid lisatakse 3-10kordses ülehulgas. Tänu hõlpsale eraldamisele on lihtne kasutada kõrget reagentide ülehulka, mis võimaldab reaktsiooniaegu kiirendada. Ühtlasi on reaktsioonikulgu keeruline jälgida, sest peptiidijärjestus on tahkel kandjal ning vaigu eraldamine, et eemaldada sellelt produkt analüüsi jaoks vähendab saagist [25,26].

Sarnaselt saab sünteesida peptoide ehk *N*-asendatud glütsiini oligomeere. Peptoidid erinevad peptiidist külghela postitsiooni poolest – kui peptiidil asetseb külghel α -süsiniku küljes, siis peptoidi korral hargneb külghel lämmastiku küljest peptiidilülis (Joonis 8). Külghela positsiooni erisus teeb peptoidist akiraalse oligomeeri. Vastupidiselt peptiididega on peptoidid vastupidavad

proteolüütilisele lagunemisele, mis annab võimaluse kasutada peptoidide kohtades, kus proteolüüs on probleem [25,26].



Joonis 8. Peptoidi ning peptiidi struktuur.

Üheks peptoidisünteesi strateegiaks on submonomeerne süntees. Süntees koosneb kahest etapist: atsüülimine ja *N*-alküülimine. Atsüülimise käigus kasutatakse tavaliselt haloäädikhapet (näiteks bromoäädikhape), mis aktiveeritakse karbodiimidiga (näiteks diisopropüülkarbodiimidiga). Alküülimise korral lisastav amiin tõrjub välja haliidi, moodustades *N*-asendatud glütsiini [27,28].

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Kasutatud kemikaalid

DMF, isopropanool (iPrOH), diklorometaan (DCM), dietüüleeter, metanool (MeOH), trietüülsilaan (TES), diisopropüületüülamiin, kollidiin (Collidine), diisopropüülkarbodiimiid (DIC), diisopropüületüülamiin (DIPEA) ja Tween 20 (P20) osteti firmas Sigma Aldrich. COMU, HBTU ning 2-klorotrietüülkloriid vaik osteti firmas Iris Biotech GmbH. HOBt, Fmoc-OSu osteti firmast Novabiochem. Bromoäädikhape ja 4-metüülmorfiin (NMM) osteti firmas Fluka. Trifluoroetaanhape (TFA), kloroform (CHCl₃), dititretiol (DTT) osteti firmast Fischer Scientific. Heksafluoroisopropanool (HFIP) osteti firmast Fluorochem. HEPES osteti firmast Calbiochem. Naatriumkloriid (NaCl) osteti firmast Riedel-de Haen.

Bioloogilistes katsetes kasutati puhvrit: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20, 5 mM DTT, pH 7,5.

3.2. Aparatuur ja töövahendid

UV-Vis-spektreid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Spektreid mõõdeti lahuses ruumalaga 1,5 µl ning optilise teepikkusega 0,1 cm. Inhibiitorite kontsentratsioonide arvutamiseks kasutati Beer-Lambert'i seadust.

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl$$

Valem 1. Beer-Lambert'i seadus. A on neeldumine, ε on neeldumiskoeffitsent ($M^{-1}cm^{-1}$) lainepikkusel λ , c on aine kontsentratsioon ning l on optiline teepikkus.

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) analüüsiks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Elueerimiseks kasutati ACN/H₂O (0,1% TFA) lahust voolukiirusega 1 ml/min. Massispektreid mõõdeti mass-spektrometriga Shimadzu ESI LC/MS-2020. Pöördfaaskromatograafia teostati kolonniga Phenomenex Gemini C₁₈ (250x4,6 mm), osakese suurusega 5 µm.

Bioaktiivsuse mõõtmised teostati mikroplaadilugejaga PHERAstar (BMG labtech). Mõõdetavad lahused valmistati 384 süvendiga mittesiduva pinnaga mikrotiiterplaadile. Enne mõõtmisi

inkubeeriti lahuseid THERMOstar mikroplaadi inkubaatoris (BMG labtech). Andmetöötuseks kasutati tarkvara Graphpad Prism (versioon 6.03).

3.3. Sünteesi eeskirjad

3.3.1. Peptoidisüntees tahkel faasil: Fmoc-[Ida(tBu)]₃ süntees

Sünteesiks kasutati tahkefaasisünteesi strateegiat. Põhisolvendina kasutati DMF-i ruumalaga ~1ml 100mg vaigu kohta. Kaaluti 1,5 g 2-CTC vaiku (*loading* = 0,55 mmol/g) PP (polüpropüleen, poori suurus 70 µm) filtriga varustatud süstlasse ning vaigul lasti lahuses punduda 1 h toatemperatuuril. Vaigu külge bromoäädikhappe (2 eq) lisamisel kasutati alusena DIPEA (4 eq) lahust DCM-is ning lasti loksutis kaks tundi reageerida. Vaik pesti 3 korda DCM-is. Vaigule liitunud bromoäädikhappele lisati GlyOtBu-HCl (5 eq), kus alusena kasutati DIPEA (6 eq) lahust DMF-is ning lasti loksutis reageerida neli tundi 40 °C juures. Vaik pesti viis korda DMF-iga. Liitunud aminohapet atsüüliti bromoäädikhappega (5 eq), kus karboksüülrühm aktiveeriti DIC-iga (5 eq) ning lasti vaigumaatriksis reageerida üks tund toatemperatuuril. Vaik pesti viis korda DMF-iga. Alküülimise ja atsüülimise etappe korrati kuni saavutati [Ida(tBu)]₃. Iga atsüülimise ning alküülimise etapi järel teostati PNBP test, et jälgida reaktsioonikulgu, mille põhjal hinnati, kas on etappi vaja korrata. Viimaks lisati peptoidi *N*-terminaalsesse otsa Fmoc rühm. Selleks lisati vaigumaatriksisse Fmoc-OSu (2 eq) ning DIPEA (2,2 eq) DCM-i lahuses ning lasti reageerida kolm tundi toatemperatuuril. Vaik pesti kolm korda DCM-iga. Järgnevalt pesti vaiku üks kord iPrOH-iga ning kolm korda DCM-iga, mille järel pandi vaik vaakumisse kuivama üleöö. Pärast kuivatust lasti vaigul punduda DCM-is ühe tunni ning seejärel eemaldati Fmoc-[Ida(tBu)]₃ vaigu küljest koos kaitserühmadega 20% HFIP lahusega DCM-is kahekordse töötusega (1 h + 30 min). Kogutud toorsaadust analüüsiti HPLC-ga ning teostati toorsaaduse puhastamine kolonnkromatograafiaga (Lisa 1-3). Puhastamise jaoks kaaluti silikageeli arvestusega, et aine mass oleks 1-2% silikageeli massist ning eluendina kasutati CHCl₃:MeOH (10:1 ruumala järgi).

3.3.2. ARC-800 – ARC-804 süntees

Kaaluti vajalik kogus vaiku, mille küljes oli [Ida(tBu)]₃-2CTC. Vaigul lasti punduda DMF-i lahuses ühe tunni toatemperatuuril. Pundunud vaigule lisati dikarboksüülhapet (10 eq), mille karboksüülrühm aktiveeriti segades kokku HOBt (3 eq), HBTU (3 eq) ning NMM (20 eq) DMF-is, lasti kolm minutit aktiveeruda ning seejärel lisati isegu vaigule üheks tunniks. Vaik pesti ühe

korra DMF-i lahusega. *t*Bu-ATB lisamiseks aktiveeriti lisatud karboksüülhappe teine karboksüülrühm HOBt (3 eq), HBTU (3 eq) ning NMM-ga (20 eq) DMF-i lahuses. Karboksüülrühmal lasti 10 minutit aktiveeruda ning vaik pesti ühe korra DMF-iga. Vaigumaatriksisse lisati *t*Bu-ATB (2 eq) ning DIPEA (5 eq) lahus DMF-s ja lahusel lasti reageerida üleöö. Vaik pesti kaks korda DMF-iga, ühe korra *i*PrOH-iga ning kaks korda DCM-iga. Vaik kuivatati vaakumis, mille järel lasti vaigul punduda ühe tunni DCM-i lahuses ning sünteesitud ARC eemaldati vaigult TFA:H₂O:TES (95:2,5:2,5 ruumala järgi). Toorsaadus analüüsiti HPLC-ga ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt ACN/0,1% TFA gradiendiga 30-45% ACN/5 min.

3.3.3. ARC-805 – ARC-808 süntees

PP filtriga varustatud süstlasse kaaluti vajalik kogus vaiku, mille külge oli eelnevalt sünteesitud peptoidahel [Ida(*t*Bu)]₃-2CTC. Vaigul lasti punduda DMF-i lahuses üks tund. ARC-805 valmistamiseks lisati vaigule esmalt Fmoc-Ida₃-O*t*Bu (3 eq). Lisatava peptoidi aktiveerimiseks kasutati COMU (2,95 eq) ning Collidine (6 eq) lahust DMF-is. Lahusesse lisati Fmoc-Ida₃-O*t*Bu, lasti kolm minutit aktiveeruda ning segu kanti üle vaigule ja lasti kaks tundi reageerida. Vaik pesti viis korda DMF-ga. Fmoc kaitserühm eemaldati 20% piperidiini lahusega DMF-is (5 + 15 min).

Pärast igat Fmoc-[Ida(*t*Bu)]₃ lisamist oli tarvis eraldada summaarsest vaigu kogusest 2,89 mg vaiku. Eraldamise teostamiseks valmistati DCM:DMF (2:1 ruumala järgi) segu, milles vaiguterad jäid suspensiooni hõljuma. Vaigule lisati lahus ning eraldati 30 µl vaigu suspensiooni pipetiga, mille külge oli kummivoolikuga kinnitatud klaasist Pasteuri pipett. Eraldatud segu kanti üle filtriga varustatud süstlasse ning pesti ühe korra DMF-iga. Vaigufraktsioonile lisati eelnevalt kolm minutit aktiveerunud dikarboksüülhappe (50 eq) HOBt (10 eq), HBTU (10 eq) ning NMM-i (20 eq) DMF-i lahuses. Segul lasti vaigul reageerida üks tund. Vaik pesti ühe korra DMF-iga. Vaigule kinnitunud dikarboksüülhappe vaba karboksüülrühm aktiveeriti HOBt (10 eq), HBTU (10 eq) ning NMM- ga (20 eq) DMF-i lahuses 10 minutit, seejärel pesti vaik ühe korra DMF-iga. Aktiveeritud karboksüülhappele lisati *t*Bu-ATB (3 eq) ning DIPEA (5 eq) lahus DMF-is ning jäeti reageerima loksutisse üleöö toatemperatuuril. Vaik pesti kaks korda DMF-iga, ühe korra *i*PrOH-iga ning kaks korda DCM-iga. Pesu järel eemaldati sünteesitud ühend vaigult kahetunnisel töötlemisel TFA:H₂O:TES (95:2,5:2,5 ruumala järgi) seguga ning teostati järelpesu TFA-ga üks kord. Lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurustis ning toorsaadus koos-vakumeeriti vähese

koguse veega TFA täielikumaks eemaldamiseks. ARC-e analüüsiti HPLC-MS-iga ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt C₁₈ kolonnis ACN/0,1% TFA gradiendiga 30-45% ACN/5 min.

3.4. Aktiivse proteiinkinaas CK2 α kontsentratsiooni määramine

Enne inhibiitorite väljatõrjumiskatse eksperimenti määrati aktiivse CK2 α kontsentratsioon. Valmistati CK2 α kahekordsete lahjenduste seeria alates kinaasi nominaalkontsentratsioonist 250 nM, millele lisati fluorestsentssond ARC-784 lõppkontsentratsiooniga 10 nM ($K_d = 21$ pM), ARC-784 lahuste kontsentratsioon mõõdeti eelnevalt UV-Vis spektromeetriga ($\epsilon = 270\,000$ M⁻¹cm⁻¹ (650nm)). Lahused valmistati 384 süvendiga mikrotiiterplaadile lõppruumalaga 20 μ l. Enne mõõtmist inkubeeriti lahuseid 30 min 30 °C juures. Lahuste TGL (Lisa 4-7) signaale mõõdeti 30 °C juures optiliste moodulitega vastavalt [EX 590(50), EM 675(50)] ja [EX 337, EM 675(50)]. Detektor kalibreeriti 10nM ARC-784 (Lisa 8) lahusega, milles puudus kinaas. Aktiivse kinaasi kontsentratsioon arvutati valemiga 2:

$$X_2 = \frac{L_t + K_d + k \times E_0 - \sqrt{(L_t + K_d + k \times E_0)^2 - 4 \times L_t \times k \times E_0}}{2 \times L_t}$$

$$X_1 = \frac{Q \times X_2}{1 + X_2 \times (Q - 1)}$$

$$A = (1 - X_1) \times A_f + X_1 \times A_b$$

, (2)

kus A on mõõdetud anisotroopia, A_f on kinaasiga mitteseondunud ARC-784 anisotroopia väärtus, A_b on ARC-784 ja kinaasi kompleksi anisotroopia väärtus, L_t on ARC-784 kontsentratsioon, E_0 on kinaasi nominaalkontsentratsioon, k on aktiivse kinaasi fraktsioon kinaasilahuses (aktiivse kinaasi kontsentratsioon kogu nominaalse kinaasi kontsentratsiooni kohta), K_d on ARC-784 ja CK2 α kompleksi dissotsiatsioonikonstant ning Q on seotud ja vaba ARC-784 fluorestsentsi intensiivsuste jagatis.

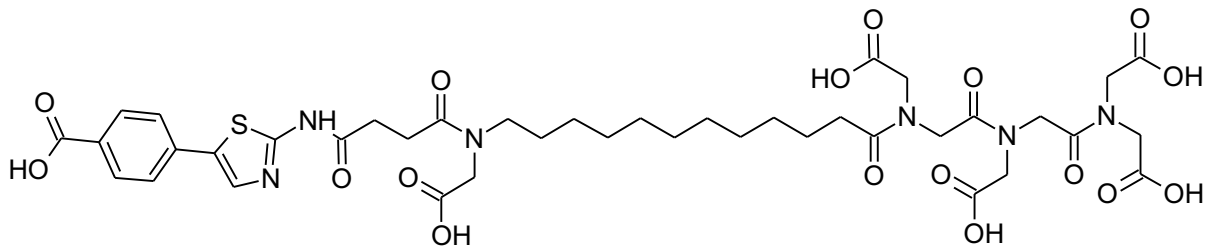
3.5. Ühendite proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine

ARC-tüüpi inhibiitorite iseloomustamiseks teostati väljatõrjumiskatsed mis sooritati kahel erineval päeval ning iga inhibiitori kohta üks paralleel. Inhibiitorite kontsentratsioonid mõõdeti enne katsete teostamist üle UV-Vis spektromeetriga ($\epsilon = 23\,000$ M⁻¹cm⁻¹ (320nm)). Kõikide lahjenduste

tegemisel kasutati neljakomponentset puhvrit ning lahuste lõppruumala mikrotiiterplaadil oli 20 μ l. ARC-800 – ARC-804 (Lisa 9-13) tehti kolmekordsed lahjendused kõrgeima kontsentratsiooniga 10 μ M, millele lisati CK2 α ja fluorestsentssondi kompleks, kus aktiivse kinaasi ja fluorestsentssondi lõppkontsentratsioonid olid vastavalt 0,75 nM ja 2nM. Võrdluseks kasutati varemiseloomustatud inhibiitorit ARC-796 ($K_d = 0,15 \pm 0,027$ nM) (Lisa 14). Varieeruva peptoidahelaga (Lisa 15-18) inhibiitoritest ARC-803 ning ARC-805 tehti kolmekordsed lahjendused kõrgeima kontsentratsiooniga 50 μ M, ARC-806 – ARC-808 inhibiitoritest tehti kolmekordsed lahjendused kõrgeima kontsentratsiooniga 10 μ M, millele lisati CK2 α ja fluorestsentssondi kompleks, kus kinaasi ja sondi lõppkontsentratsioonid olid vastavalt 0,75 nM ja 20nM. Võrdlusinhibiitoriks kasutati ARC-803. Enne mõõtmisi inkubeeriti lahuseid 30 °C juures kaks korda ja mõõdeti kaks korda, 30 min ja 60 min järel. Kasutati samu optilisi mooduleid, mida ka aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramisel.

4. Tulemused ja arutelu

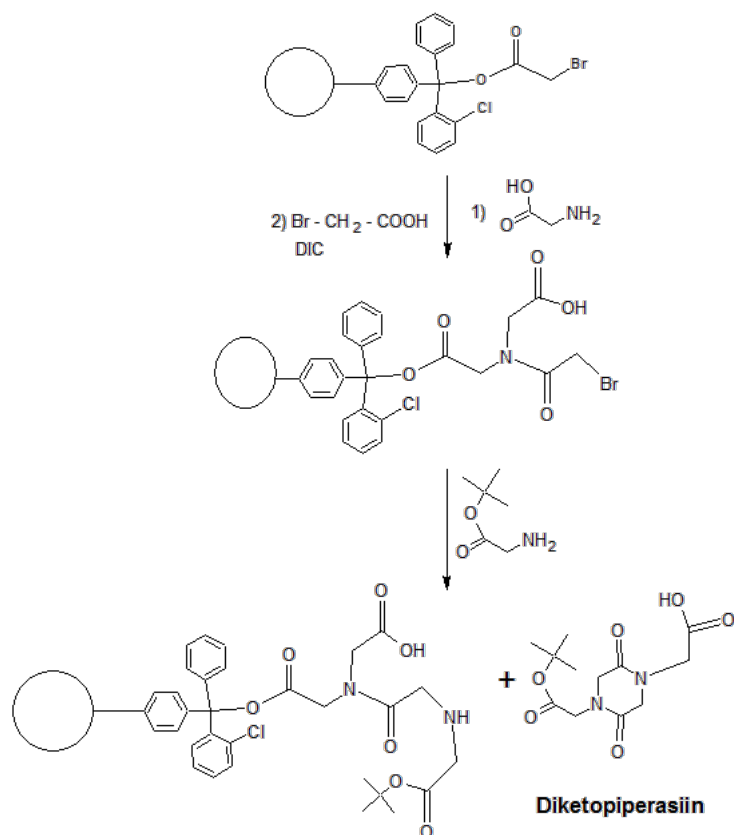
Töö eesmärk oli teostada eelnevalt publitseeritud bisubstraatse inhibiitori ARC-772 (Joonis 9) peptoidlülil ja lihtsustatud vahelülil proteiinkinaasi CK2 katalüütilisele alatühikule seondumise struktuur-aktiivsussõltuvus. ARC-772 on ATB ning Ida konjugaat, mille kahte CK2-ga interakteeruvat fragmenti ühendab vahelülil, mis koosneb suktsiinhappest ja ω -amino-12-alkaanhappest. Käesolevas töös lihtsutati vahelülil vormi ehk kahe happefragmenti asemel kasutati ühte dikarboksüülhapet. ARC-772 teeb märkimisväärseks selektiivsuse, inhibeerimisvõimekus. ARC-772 viimisel eelravimivormi negatiivselt laetud karboksüülrühmade esterdamise teel suurenes plasmamembraani läbitavusvõime, mille tulemusena tõusis rakusisene kontsentratsioon võrreldes esterdamata vormiga rohkem kui 100 korda. ARC-772 puhul on näidatud, et peptoidahela ning vahelülil pikenedisel suurenes afiinsus CK2 suhtes [5].



Joonis 9. ARC-772 struktuur.

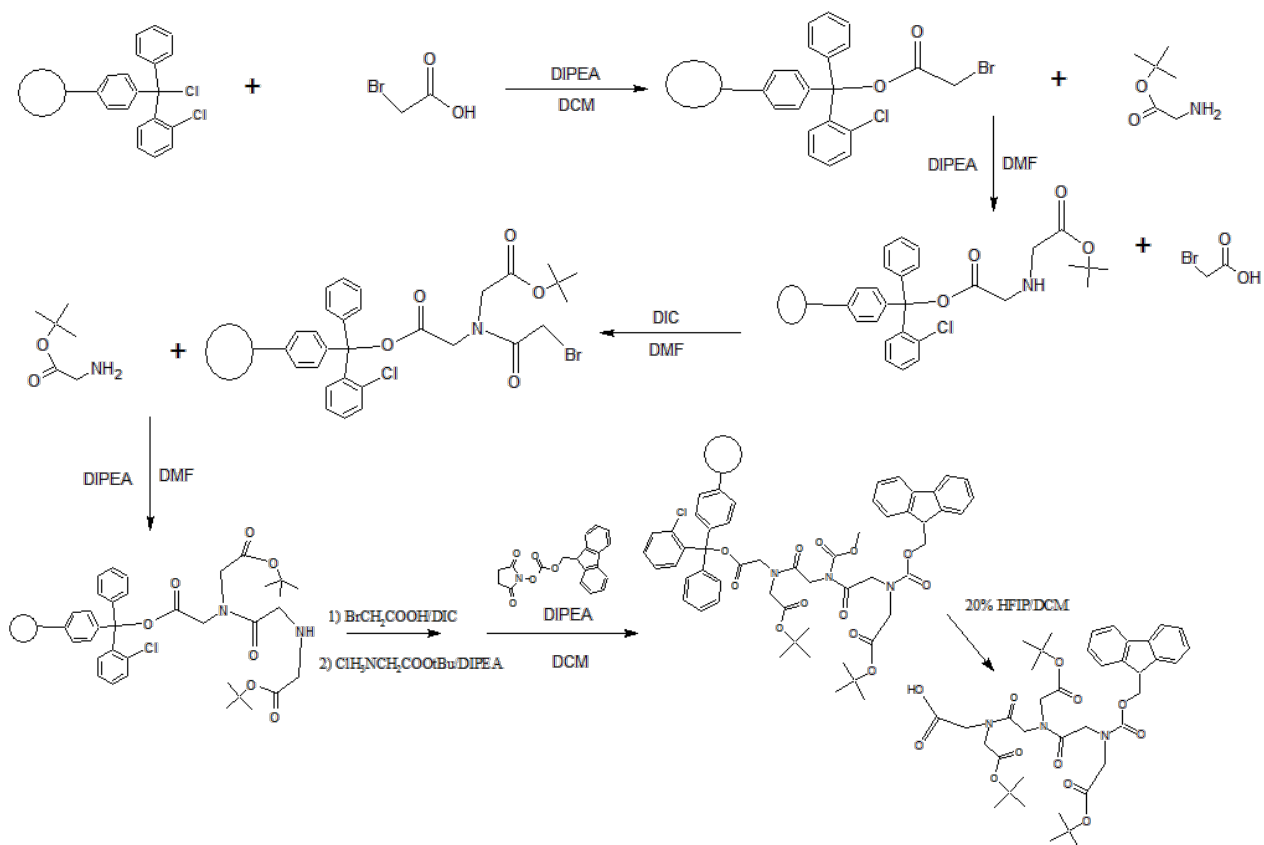
Struktuur-aktiivsussõltuvus alustati ARC-772-ga identse peptoidahelaga, kuid lihtsama struktuuriga ATB-(Ida)_n konjugaadi konstrueerimisega. Valmistati seeria erineva vahelülil pikkusega ühendeid, mis ühendasid kolmest iminodietaanhappejäägist koosneva peptoidi ATB fragmendiga. Viie erineva vahelülil pikkusega valmistatud inhibiitori seast valiti üks võimeka afiinsusega inhibiitor ning valitud vahelülil pikkust hakati kinnitama varieeritud pikkusega peptoidahelatega inhibiitoritele edasise struktuur-aktiivsussõltuvuse jaoks.

Esmalt oli vaja sünteesida kolmelüliline peptoidahel. Peptoid (iminodiädikhape)₃ (Ida₃) sünteesiti tahkefaassünteesi strateegiaga. Tahke kandjana kasutati 2-CTC vaiku, mis steriilise takistuse tõttu takistab diketopiperasiini moodustumist (Joonis 10) [29].



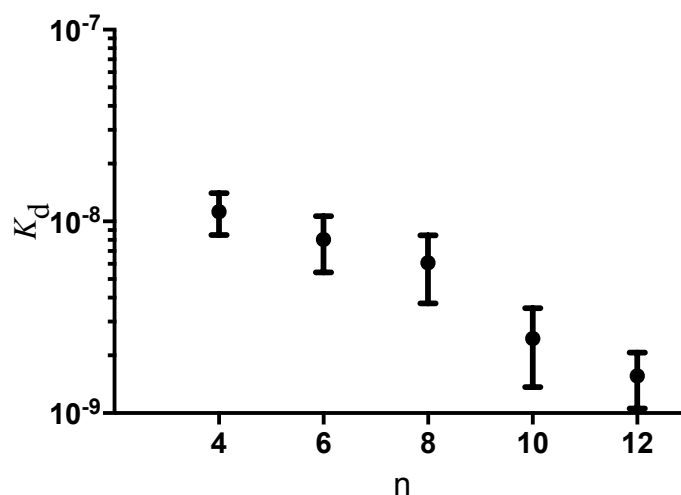
Joonis 10. Diketopiperasiini moodustumine.

Süntees algas bromoäädikhappe lisamisega vaigule (Skeem 2). Lisatavate aminohapete karboksüülrühmad olid kaitstud *tert*-butüülestritena (*t*Bu). Reaktsioonikulgu jälgiti PNBP testiga (tõestab alküülvate reagentide olemasolu vaigu küljes) pärast iga karboksüülhappe ning aminohappe lisamist. Vaigutera värvumisel pärast aminohappe lisamist tuli etappi korrata, kuna esines terasid, millele polnud aminohape külge liitunud. Mittevärvunud vaigutera esinemine pärast bromoäädikhappe lisamist tähendas etapi kordamist, sest bromoäädikhape polnud täielikult vaigule liitunud. Sünteesitud ARC-d eemaldati vaigult ning ühendid tõestati tuginedes massile, mida mõõdeti mass-spektromeetriselt (Lisa 19-23) ning teostati väljatõrjumiskatsed (Lisa 24-27).



Skeem 2. Submonomeerne peptoidi süntees. Fmoc-[Ida(tBu)]₃ süntees.

Sarnaselt ARC-772 arenduse tulemustele, olid pikema kui neljalülilise vahelüliga sünteesitud ARC-id (Joonis 11) suurema afiinsusega kui peptoidiga konjugeerimata ATB (K_d (ATB) = 47 ± 7 nM) [5], kus parima afiinsuse saavutas ARC-804 (K_d = $1,56 \pm 0,5$ nM). Vahelüli pikenedamine kahe süsiniku võrra põhjustas pea kahekordse afiinsuse tõusu.



Joonis 11. Dissotsiatsioonikonstant vs vahelüli pikkus, n on süsinike arv vahelüli struktuuris.

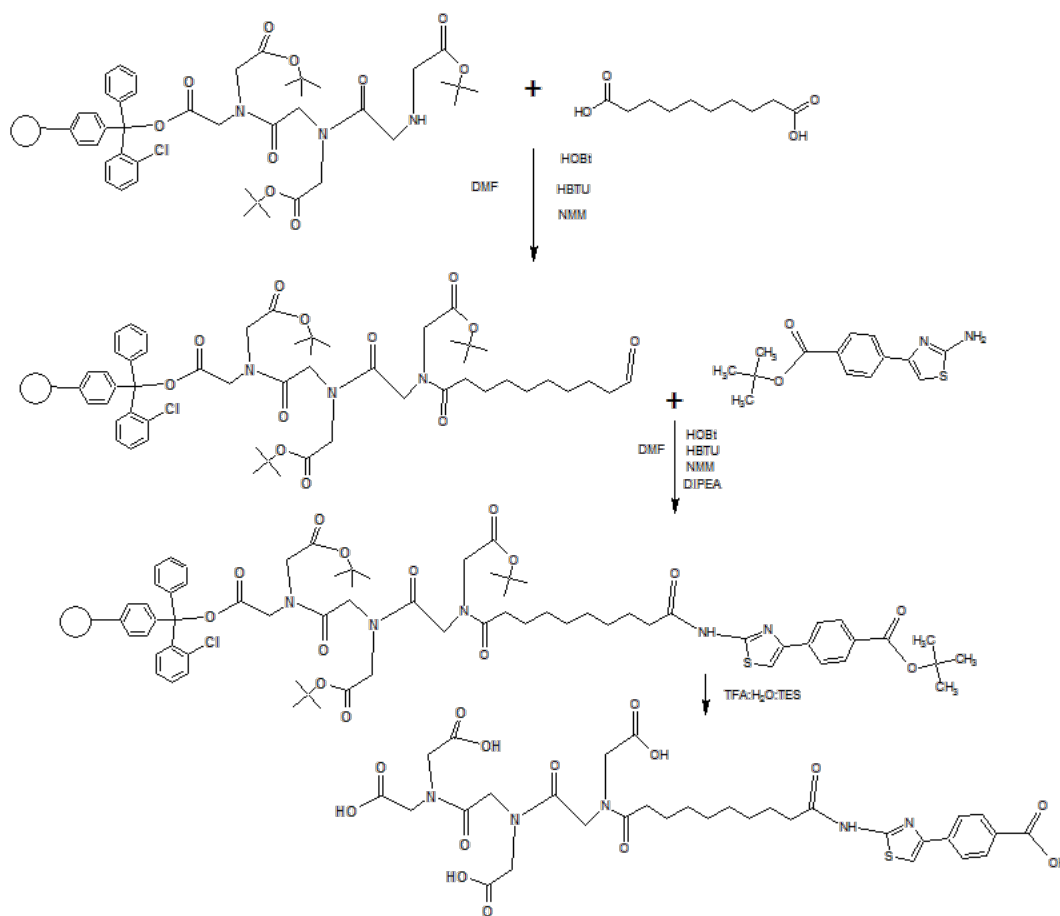
Viie valmistatud inhibiitori (Tabel 1) seast valiti üks inhibiitor ning valitud vahelüli pikkust hakati kinnitama varieeruvate peptoidahelatega inhibiitoritele edasise struktuur-aktiivsussõltuvuse jaoks. Tulemustele põhinedes valiti edasiseks konjugeerimiseks ARC-803 ($K_d = 2,16 \pm 1,08$ nM).

Tabel 1. Sünteesitud varieeruva vahelüli pikkusega ARC inhibiitorite dissotsiatsioonikonstandid.

Ühendi kood	Molaarmass (g/mol)	Süsinike arv vahelülis (<i>linkeri</i> pikkus)	Ida lülide arv peptoidahelas	K_d / nM
ARC-800	665,58	4	3	$11,25 \pm 2,76$
ARC-801	693,64	6	3	$8,04 \pm 2,62$
ARC-802	721,69	8	3	$6,09 \pm 2,35$
ARC-803	749,75	10	3	$2,45 \pm 1,08$
ARC-804	777,80	12	3	$1,56 \pm 0,5$

Kiiremaks peptoidahela kasvatamiseks sünteesiti eraldi Fmoc-kaitstud aminohape Fmoc-[Ida(tBu)]₃. Fmoc-[Ida(tBu)]₃ kui aminohappe oligomeeride valmistamiseks saab kasutada peptiidisünteesi meetodeid, mis on efektiivsemad kui peptiidide submonomeerse sünteesi meetodid. Ida trimeeride üksteise otsa panek võimaldab kiiremini saavutada pika ahelaga ühendeid kui neid monomeere üksteise otsa panna ükshaaval. Kogutud aine koguse tõttu ei olnud optimaalne puhastamist teostada HPLC-ga, seega kasutati puhastamiseks kolonnkromatograafia meetodit. Ühendile sobiva eluendi leidmiseks teostati planaarkromatograafia ning vähesel määral oli võimalik eristada kahte laiku, mis tähendas lisandite olemasolu. Analüüsi teostades ilmnes, et vaba karboksüülrühma tõttu tekkisid interaktsioonid silikageeliga, mis põhjustas aine sabatamist. Eluendi optimeerimiseks katsetati 15 eluenti (Lisa 28). Interaktsioonide vältimiseks prooviti lisada eluendi segusse 1%-0,1% etaanhapet või 1%-0,1% metaanhapet. Hapete lisamine eluenti vähendas sabatamist, kuid kõrvalsaaduste lahutamine ei õnnestunud. Kloroformi osakaalu tõstmine kloroform:metanool segus põhjustas kehvemat lahutust. Otsustati optimaalseima segu, kloroform:metanool (10:1 ruumala järgi) kasuks, saadud fraktsioone analüüsiti HPLC-ga.

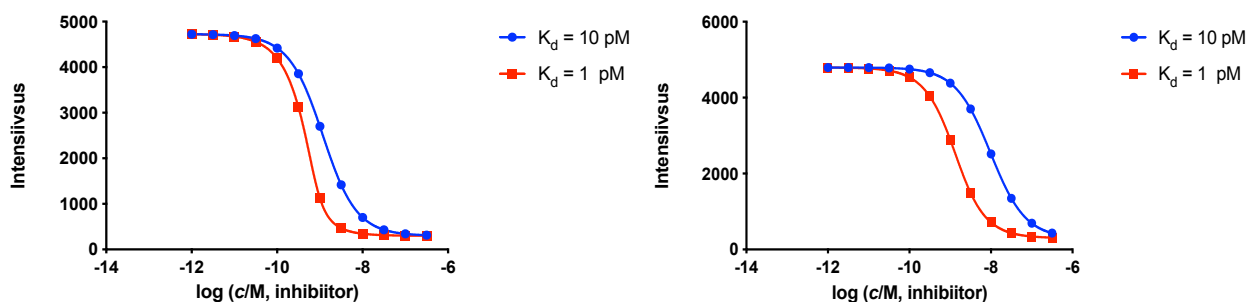
Varieeruva pikkusega peptoidahelaga ARC sünteesiks (Skeem 3) viidi peptoidahela kasvatamiseks vajalikud kondensatsioonireaktsioonid läbi ühes sünteesinõus, millest iga Fmoc-[Ida(tBu)]₃ lisamise järel eraldati kindel alikvoot resinit vastava peptoidahela pikkusega ARC sünteesiks. Vähesese koguse lähteaine tõttu tuli arendada modifitseeritud sünteesinõu (Lisa 29-30) ning leida moodus vaigususpensiooni eraldamiseks. Sünteesinõu peensuse tõttu võeti pipetiotsikuna kasutusele klaasist Pasteuri pipett, mis ühendati digitaalpipetiga kummivooliku abil (Lisa 31). Vaigususpensioon tekitati DCM:DMF (2:1 ruumala järgi) segusse. Valmistati seeria konjugeeritud peptoidahelaga inhibiitoreid, mida ühendas ATB-ga sebotsiinhape vahelüli. Seeriad analüüsiti, tõestati, puhastati HPLC-ga (Lisa 32-35) ning teostati väljatõrjumiskatsed (Lisa 36-39).



Skeem 3. ARC-803 sünteesiskeem.

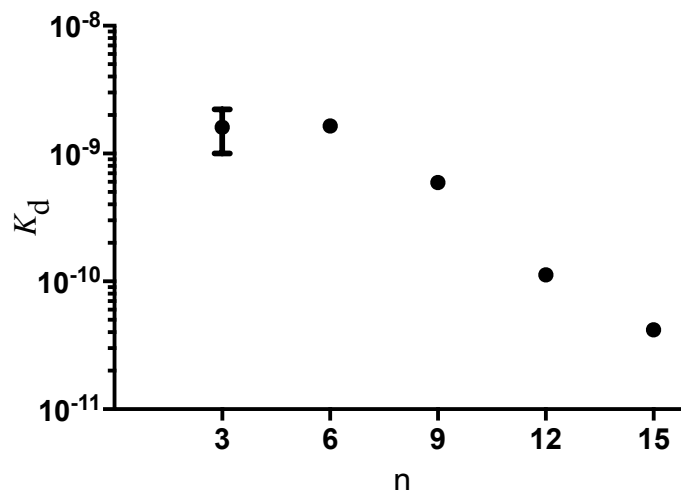
Varasemast kirjandusest [5] on teada, et peptoidahela pikenedes ühendite affiinsus CK2 suhtes kasvab. Eeldusel, et sama kehtib ka töös sünteesitud ühendite korral ning võttes arvesse kolme Ida lüli sisaldava lähtestruktuuri ARC-803 juba märkimisväärselt kõrget affiinsust ($K_d = 2,45 \pm 1,08$

nM) ja eksperimentides kasutatud konkureeriva fluorestsentsligandi kontsentratsiooni (ARC-784 lõppkontsentratsioon mikrotiiterplaadil 2nM), muutuksid pikomolaarsed inhibiitorit üksteisest eristamatuks (Joonis 12). Sellest tulenevalt oli vajalik simuleerida kõverad, kus optimeeriti fluorestsentsligandi kontsentratsiooni arvestusega, kui inhibiitorid saavutavad pikomolaarsed afiinsused. Simuleeritud andmed toetasid eeldust, et vähese fluorestsentsligandi kontsentratsiooniga nihkuvad kõverad kokku ning määramatust arvesse võttes, ei oleks uuritavad inhibiitorid eristatavad. Tuginedes simuleeritud andmetele otsustati seondumise iseloomustamisel kasutada mikrotiiterplaadil fluorestsentssondi lõppkontsentratsiooni 20 nM (1000 korda üle ARC-784 K_d väärtuse).



Joonis 12. Simuleeritud andmed, kus fluorestsentsligandi lõppkontsentratsiooniks on 2 nM (vasak graafik) või 20 nM (parem graafik). Legendil uuritava inhibiitori dissotsiatsioonikonstandi väärtus.

Sarnaselt varasemalt publitseeritud andmetega [5] on märgata afiinsuse kasvutrendi peptoidahela pikenedes, kus parimat afiinsust omas ARC-808 ($K_d = 0,042 \pm 2,33$ pM) ületades ARC-772 afiinsuse ($K_d = 0,3 \pm 0,1$) (Joonis 13) [5].



Joonis 13. Dissotsiatsioonikonstant vs peptoidahela pikkus, n on iminodietaanhappe jääkide arv peptoidi struktuuris.

Peptoidahela pikenedes erisust kolmelülilise ning kuuelülilise peptoidahela vahel ei esinenud, kuid pikemate ahelatega ühendite korral esines lineaarne sõltuvus peptoidahela pikkuse ning afiinsuse vahel. Iga Ida_3 jäägi lisandumisel oli keskmiselt kolmekordne afiinsuse kasv (Tabel 2). Peptoidjärjestuse pikendamine suurendas ühendite afiinsust rohkem kui vahelüli pikendamine.

Tabel 2. Sünteesitud varieeriva peptoidahelaga ARC inhibiitorite dissotsiatsioonikonstandid.

Ühendi kood	Molaarmass (g/mol)	Süsinike arv vahelülis (<i>linkeri</i> pikkus)	Ida lülide arv peptoidahelas	K_d / nM
ARC-803	749,75	10	3	$2,45 \pm 1,08$ nM
ARC-805	1095,01	10	6	$1,65 \pm 0,046$ nM
ARC-806	1440,27	10	9	$0,59 \pm 0,045$ nM
ARC-807	1785,54	10	12	$0,11 \pm 0,0014$ nM
ARC-808	2130,80	10	15	$0,041 \pm 0,0023$ nM

5. Kokkuvõte

Töö eesmärkideks oli ARC-772-ga identse peptoidahelaga, kuid lihtsama struktuuriga vahelüliga ATB-(Ida)_n konjugaadi konstrueerimine ja selleks vajaliku struktuur-aktiivsussõltuvuse koostamine ning näha, kuidas suureneb afiinsus (Ida)_n peptoidahela pikenedes. Varasemalt on täheldatud, et nii vahelüli kui ka peptoidahela pikenedes saavutatakse pikomolaarne afiinsus kinaasi vastu [5].

Ühendid sünteesiti lahustumatul polümeersel tahkel kandjal kasutades peptiidi- ning peptoidisünteesi meetodeid. Sarnaselt varasemalt publitseeritud tulemustega [5] vahelüli pikenedes suurenes afiinsus CK2 suhtes, kus afiinsused küündisid nanomolaarsesse suurusjärku. Afiinsus suurenes pea kaks korda kahe lisatud lüli kohta. Sarnaselt varasemalt publitseeritud tulemustega [5] peptoidahela pikenedes täheldati lineaarset afiinsuse kasvu, kus iga Ida₃ jäägi lisandumisel oli keskmiselt kolmekordne afiinsuse kasv. Peptoidjärjestuse pikendamine kasvatas ühendite afiinsust rohkem kui vahelüli pikendamine.

Sünteesitud ühenditega ei saavutatud afiinsuse optimumi ei vahelüli ega peptoidahela pikkuse suurendamisel, mis annab võimaluse ühendite edasiseks optimeerimiseks.

Development of thiazole ring-comprising bisubstrate inhibitors of protein kinase CK2

Kajjus Janis

6. Summary

The aim of the present work was to develop a series of bisubstrate inhibitors with varying length of the linker between the CK2-interacting structural fragments and a series of substrate mimicking carboxyl group-rich peptoid conjugates. The aim was based on a previous publication, where the increase of affinity was observed when conjugating the length of the linker and the carboxyl group-rich peptoid.

The theoretical part of the thesis gave a review on the properties and functions of protein kinase CK2, the development of inhibitors for CK2, a brief overview of solid phase peptide synthesis and a method for evaluating the activity of inhibitors. Also, an explanation was given as to why luminescence occurs.

In the experimental part of the thesis a detailed description of the experimental procedures was given. A series of inhibitors with varying linker lengths were synthesized and examined by binding assays. An approximate 2-fold increase in affinity was observed when increasing the linker length by two carbons. Based on the results, the linker from a potent inhibitor was chosen for further development. A series of carboxyl group-rich peptoid conjugates were synthesized and examined by binding assays. Affinity increased with the number of negatively charged Ida residues in the peptoid chain, as was observed in previous publications. An approximate 3-fold increase in affinity was observed per three additional Ida residues added to the peptoid chain. Optimum of affinity from neither of the binding assays was achieved, which leaves way for further development of the synthesized inhibitors in this work.

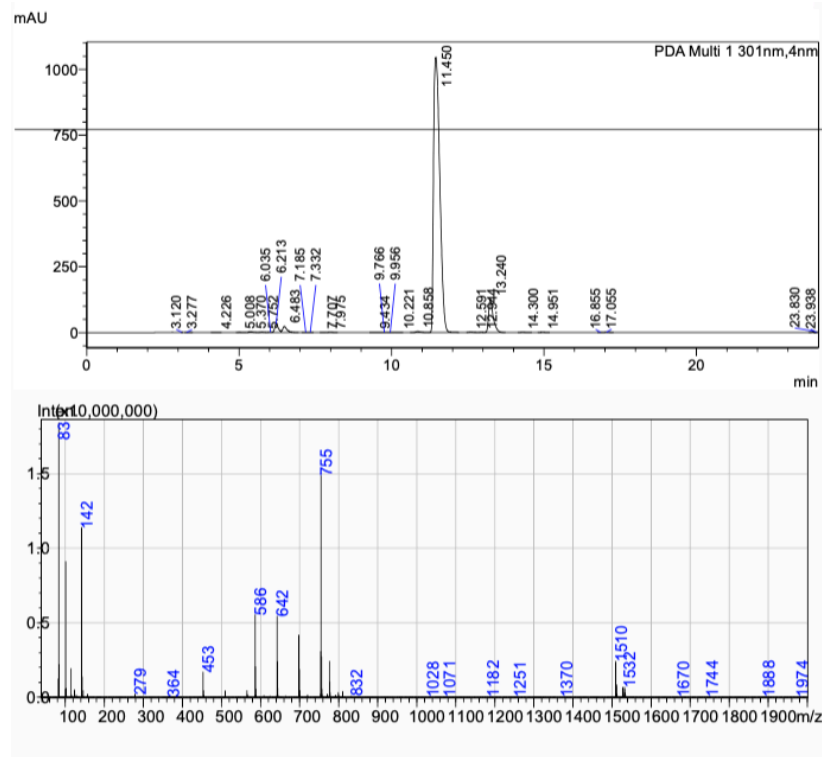
7. Kasutatud kirjandus

1. Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorganic Chemistry*. December 2011, pp 192–210.
2. Vahter, J.; Viht, K.; Uri, A.; Manoharan, G. babu; Enkvist, E. Thiazole- and Selenazole-Comprising High-Affinity Inhibitors Possess Bright Microsecond-Scale Photoluminescence in Complex with Protein Kinase CK2. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**.
3. Ljubimov, A. V.; Caballero, S.; Aoki, A. M.; Pinna, L. A.; Grant, M. B.; Castellon, R. Involvement of Protein Kinase CK2 in Angiogenesis and Retinal Neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45* (12), 4583–4591.
4. Ruzzene, M.; Pinna, L. A. Addiction to Protein Kinase CK2: A Common Denominator of Diverse Cancer Cells? *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (3), 499–504.
5. Rahnel, H.; Viht, K.; Lavogina, D.; Mazina, O.; Haljasorg, T.; Enkvist, E.; Uri, A. A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation. *ChemMedChem* **2017**, *12* (20), 1723–1736.
6. Viht, K.; Saaver, S.; Vahter, J.; Enkvist, E.; Lavogina, D.; Sinijärv, H.; Raidaru, G.; Guerra, B.; Issinger, O.-G.; Uri, A. Acetoxymethyl Ester of Tetrabromobenzimidazole–Peptoid Conjugate for Inhibition of Protein Kinase CK2 in Living Cells. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (12), 2324–2335.
7. Roskoski, R. A Historical Overview of Protein Kinases and Their Targeted Small Molecule Inhibitors. *Pharmacological Research*. Academic Press August 1, 2015, pp 1–23.
8. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (80-.)*. **2002**, *298* (5600), 1912–1934.
9. Cohen, P. The Origins of Protein Phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4* (5).
10. Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-Affinity Bisubstrate Probe for Fluorescence Anisotropy Binding/Displacement Assays with Protein Kinases PKA and ROCK. *Anal. Biochem.* **2009**, *385* (1), 85–93.

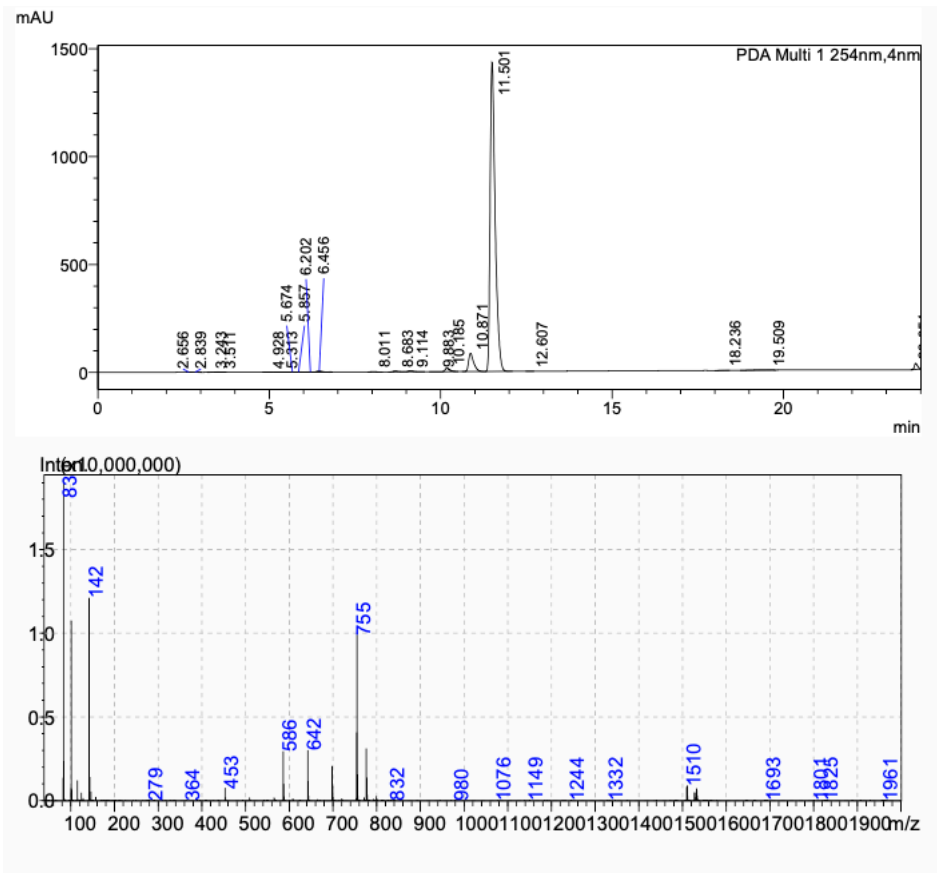
11. Enkvist, E.; Lavogina, D.; Raidaru, G.; Vaasa, A.; Viil, I.; Lust, M.; Viht, K.; Uri, A. Conjugation of Adenosine and Hexa-(D-Arginine) Leads to a Nanomolar Bisubstrate-Analog Inhibitor of Basophilic Protein Kinases. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (24), 7150–7159.
12. Lian, H.; Su, M.; Zhu, Y.; Zhou, Y.; Soomro, S. H.; Fu, H. Protein Kinase CK2, a Potential Therapeutic Target in Carcinoma Management. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2019**, *20* (1), 23–32.
13. Montenarh, M. Cellular Regulators of Protein Kinase CK2.
14. Pinna, L. A. Protein Kinase CK2: A Challenge to Canons. *J. Cell Sci.* **2002**, *115* (20), 3873–3878.
15. Franchin, C.; Borgo, C.; Zaramella, S.; Cesaro, L.; Arrigoni, G.; Salvi, M.; Pinna, L. A. Exploring the CK2 Paradox: Restless, Dangerous, Dispensable. *Pharmaceuticals*. MDPI AG March 1, 2017.
16. Pierre, F.; Chua, P. C.; O'Brien, S. E.; Siddiqui-Jain, A.; Bourbon, P.; Haddach, M.; Michaux, J.; Nagasawa, J.; Schwaebe, M. K.; Stefan, E.; Vialettes, A.; Whitten, J. P.; Chen, T. K.; Darjania, L.; Stansfield, R.; Anderes, K.; Bliesath, J.; Drygin, D.; Ho, C.; Omori, M.; Proffitt, C.; Streiner, N.; Trent, K.; Rice, W. G.; Ryckman, D. M. Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino)Benzo[c][2,6]Naphthyridine-8- Carboxylic Acid (CX-4945), the First Clinical Stage Inhibitor of Protein Kinase CK2 for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (2), 635–654.
17. Bogoyevitch, M. A.; Barr, R. K.; Ketterman, A. J. Peptide Inhibitors of Protein Kinases - Discovery, Characterisation and Use. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*; 2005; Vol. 1754, pp 79–99.
18. Uri, A.; Lust, M.; Vaasa, A.; Lavogina, D.; Viht, K.; Enkvist, E. Bisubstrate Fluorescent Probes and Biosensors in Binding Assays for HTS of Protein Kinase Inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. March 2010, pp 541–546.
19. Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: From Principle to Practical Applications. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 23–34.

20. Luminescence - Luminescence excitation | Britannica.com
<https://www.britannica.com/science/luminescence/Luminescence-excitation> viimati alla laetud 27.05.2020.
21. Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds*; Wiley: Chichester, 2009.
22. Jablonski Diagram - Chemistry LibreTexts.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram) viiamti alla laetud 27.05.2020.
23. Alberti, S.; Parks, D. R.; Herzenberg, L. A. A Single Laser Method for Subtraction of Cell Autofluorescence in Flow Cytometry. *Cytometry* **1987**, 8 (2), 114–119.
24. Fluorescence Intensity Measurements | BMG LABTECH.
<https://www.bmglabtech.com/time-resolved-fluorescence/> viimati alla laetud 27.05.2020.
25. Chan, W. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; University Press: Oxford, 2004.
26. Lloyd-Williams, P.; Palomera, F. A.; Lledó, E. G. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press: Boca Raton, 1997.
27. Culf, A. S.; Ouellette, R. J. Solid-Phase Synthesis of N-Substituted Glycine Oligomers (α -Peptoids) and Derivatives. *Molecules* **2010**, 15 (8), 5282–5335.
28. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moosf, W. H.; Kent, S. B. H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (26), 10646–10647.
29. Anne, C.; Fournié-Zaluski, M. C.; Roques, B. P.; Cornille, F. Solid Phase Synthesis of Peptoid Derivatives Containing a Free C- Terminal Carboxylate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (49), 8973–8974.

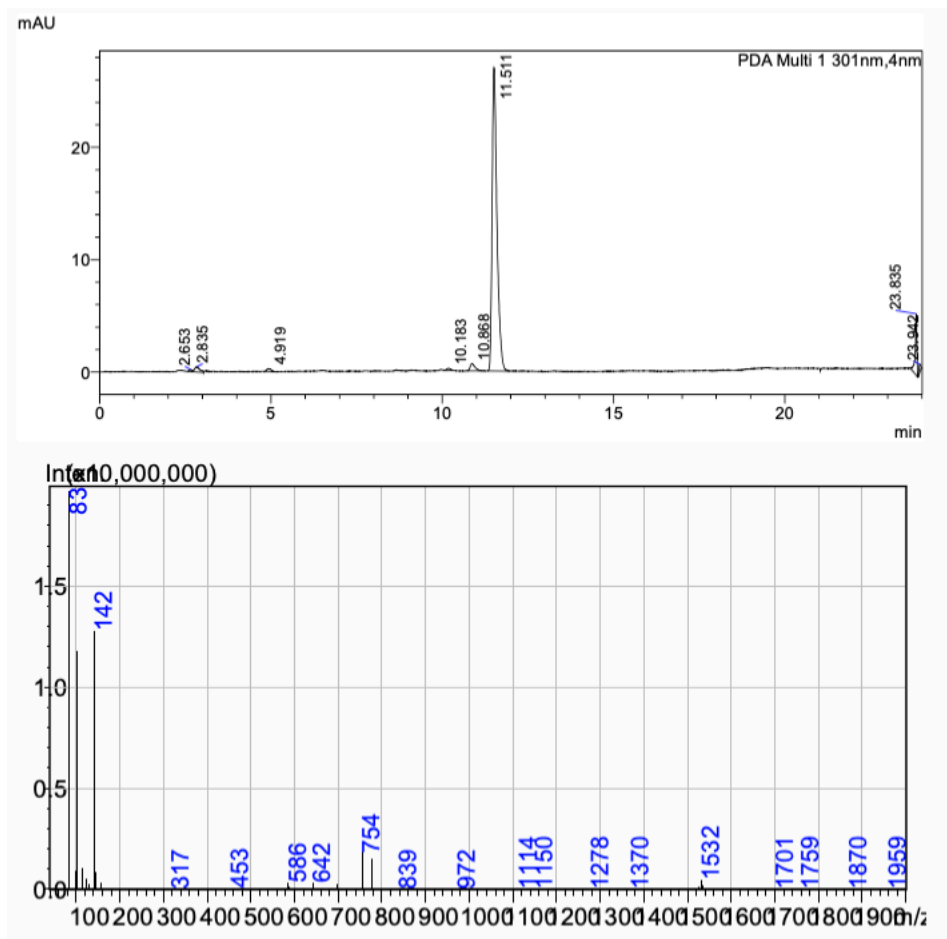
8. Lisad



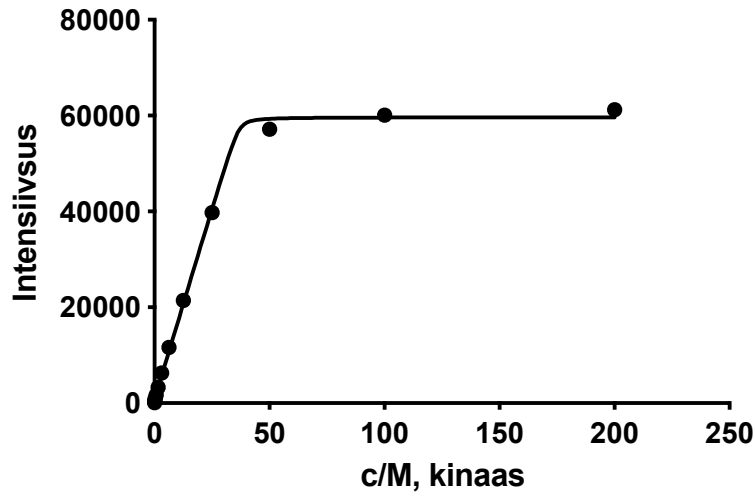
Lisa 1. Fmoc-[Ida(tBu)]₃ puhta fraktsiooni HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



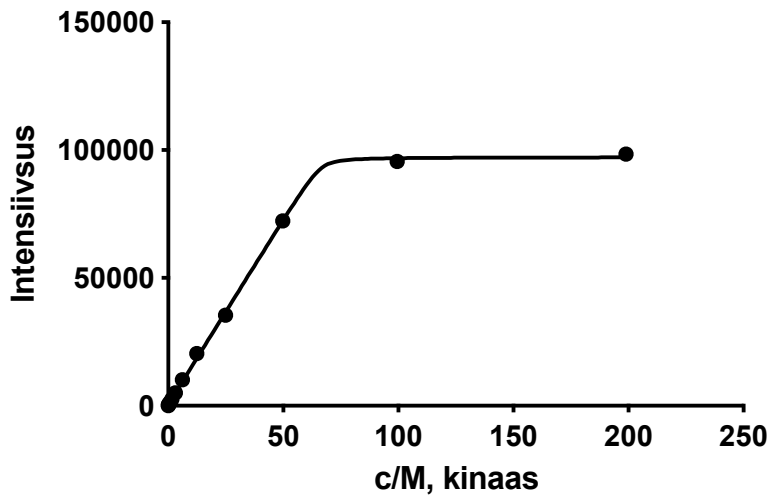
Lisa 2. Lisanditega Fmoc-[Ida(tBu)]₃ HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



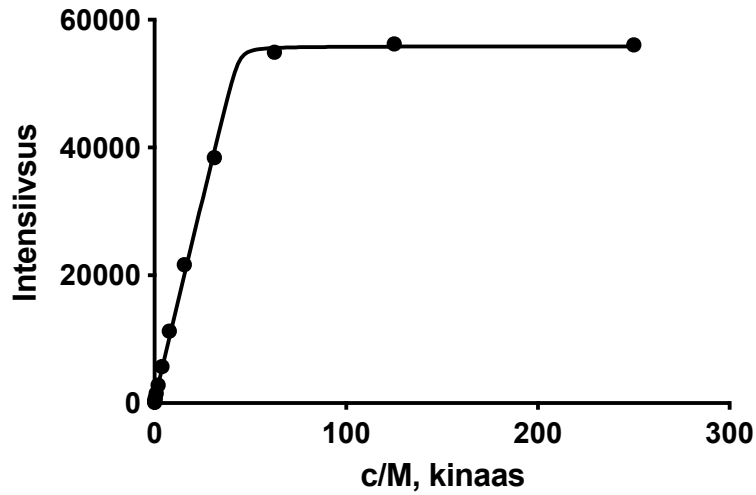
Lisa 3. Fmoc-[Ida(tBu)]₃ toorsaduse HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



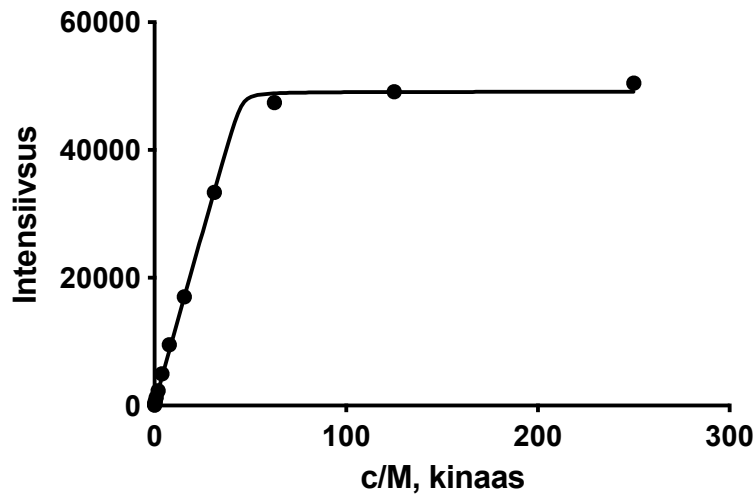
Lisa 4. ARC-800 - ARC-804 aktiivse kontsentratsiooni määramine esimene paralleel. CK2 aktiivne kontsentratsioon oli 27,12% nominaalsest kontsentratsioonist.



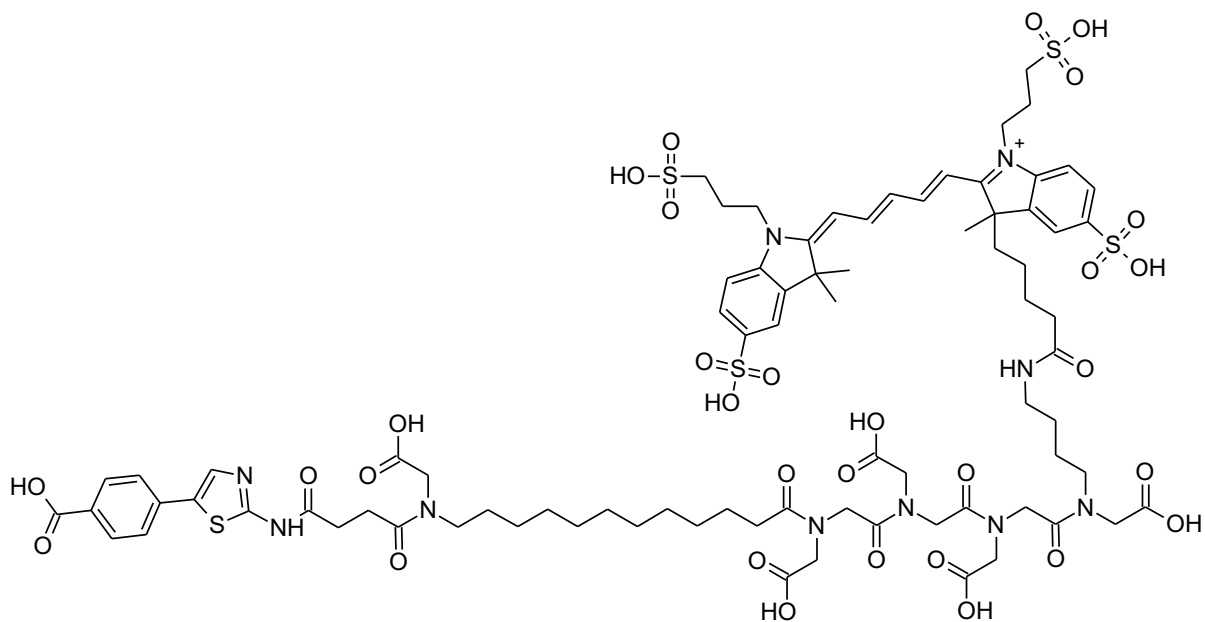
Lisa 5. ARC-800 - ARC-804 aktiivse kontsentratsiooni määramine teine paralleel. CK2 aktiivne kontsentratsioon oli 15,04% nominaalsest kontsentratsioonist.



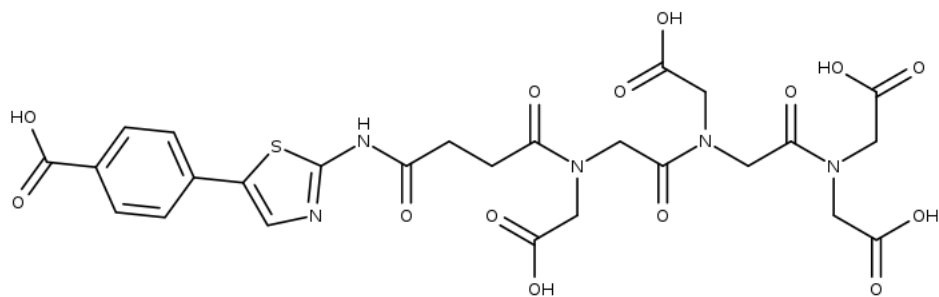
Lisa 6. ARC-803, ARC-805 – ARC-808 aktiivse kontsentratsiooni määramine esimene paralleel. CK2 aktiivne kontsentratsioon oli 22,07% nominaalsest kontsentratsioonist.



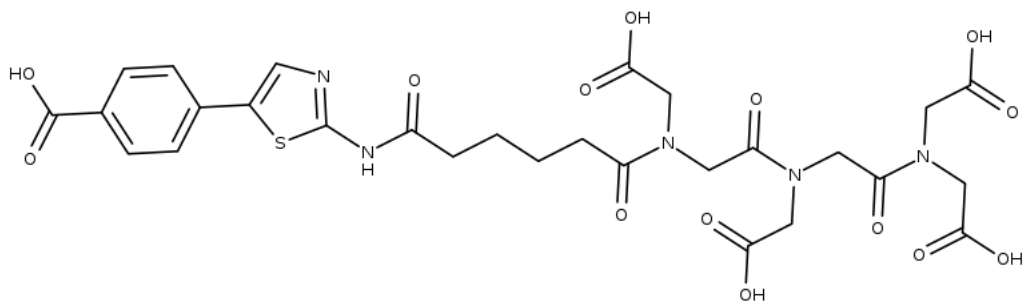
Lisa 7. ARC-803, ARC-805 – ARC-808 aktiivse kontsentratsiooni määramine teine paralleel. CK2 aktiivne kontsentratsioon oli 21,97% nominaalsest kontsentratsioonist.



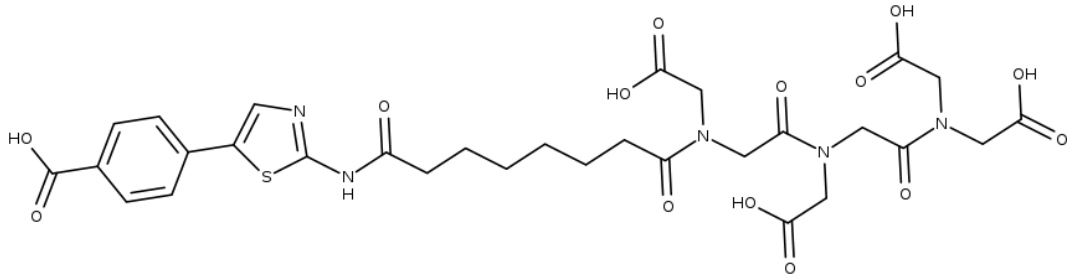
Lisa 8. ARC-784 structuur.



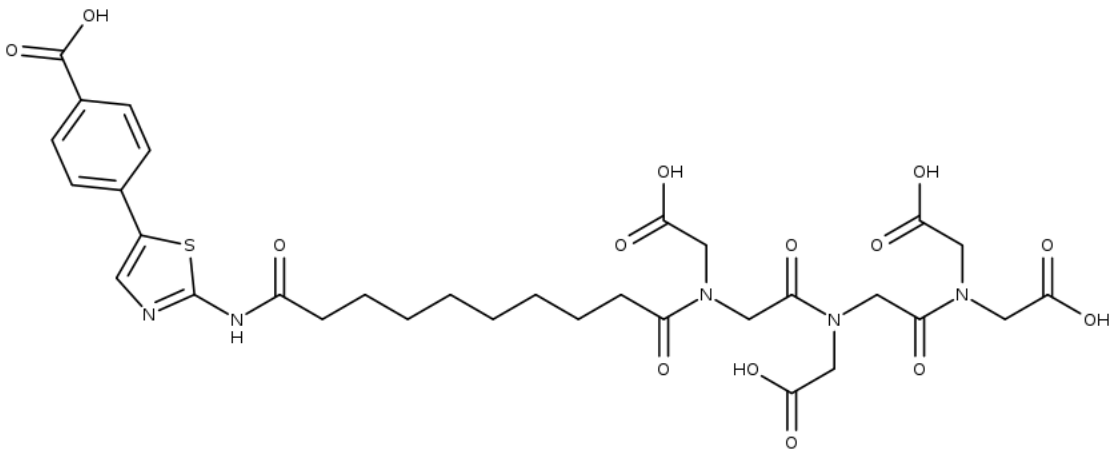
Lisa 9. ARC-800 structuur.



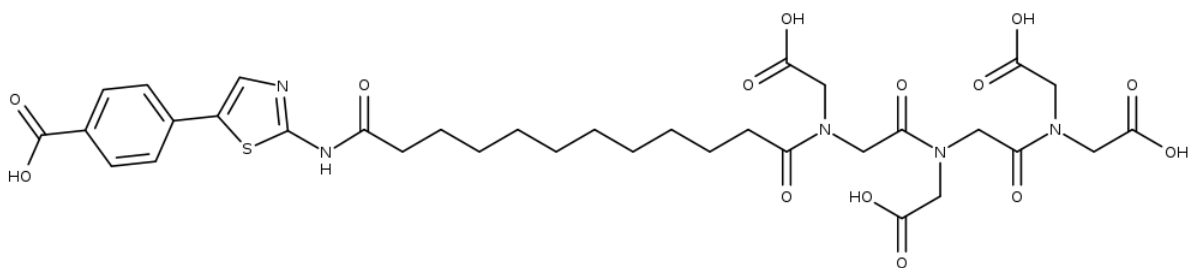
Lisa 10. ARC-801 structuur.



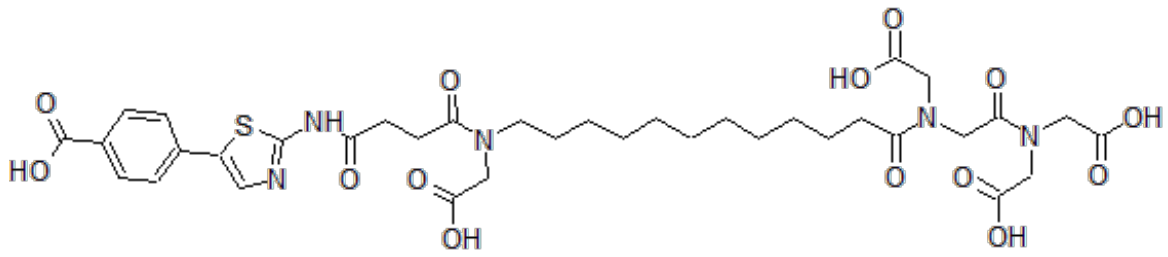
Lisa 11. ARC-802 structuur.



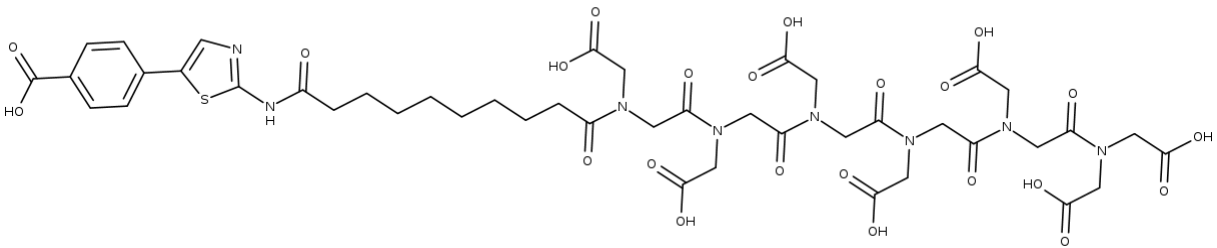
Lisa 12. ARC-803 structuur.



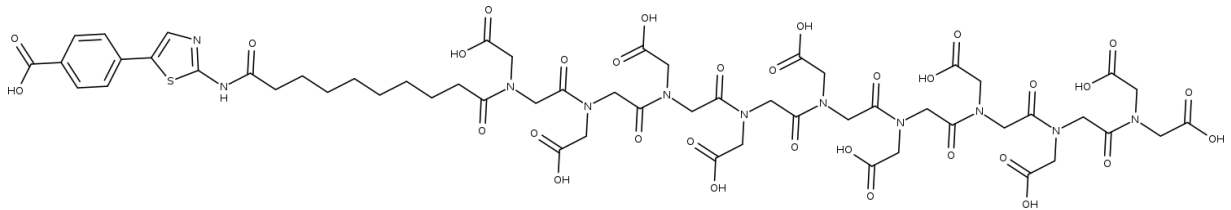
Lisa 13. ARC-804 structuur.



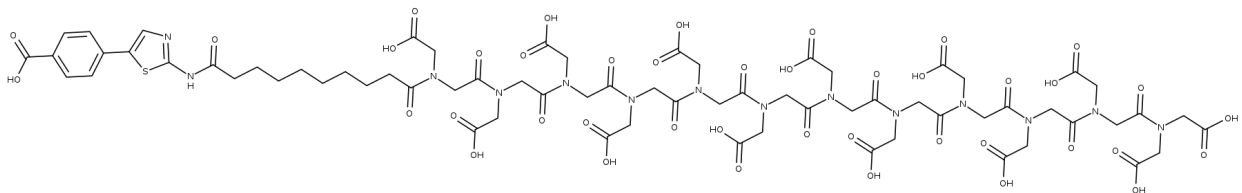
Lisa 14. ARC-796 structuur.



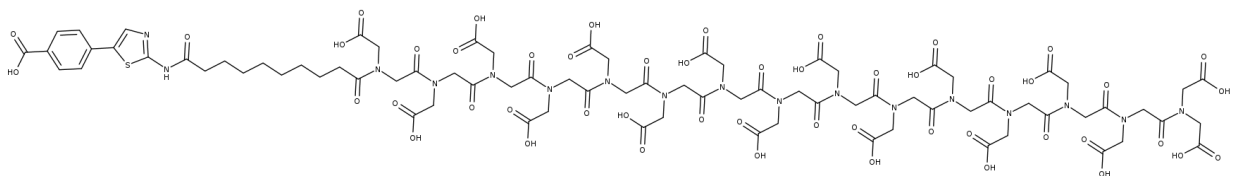
Lisa 15. ARC-805 structuur.



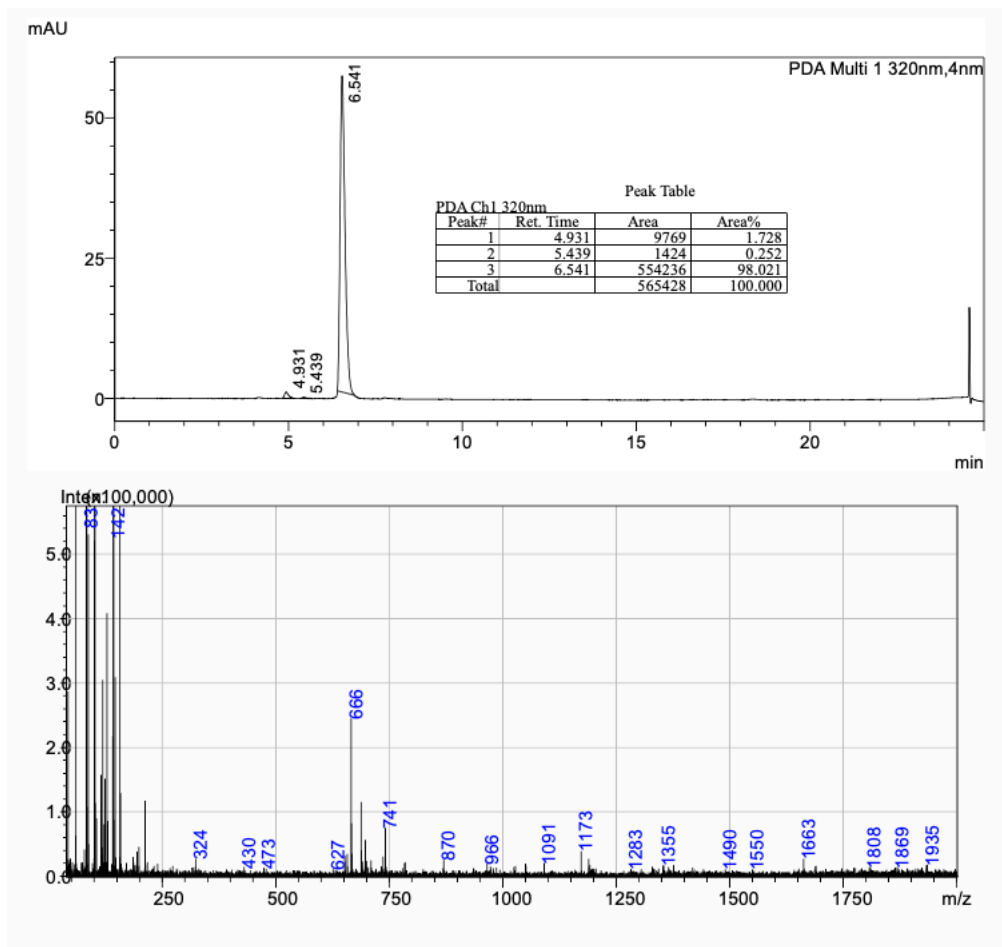
Lisa 16. ARC-806 structuur.



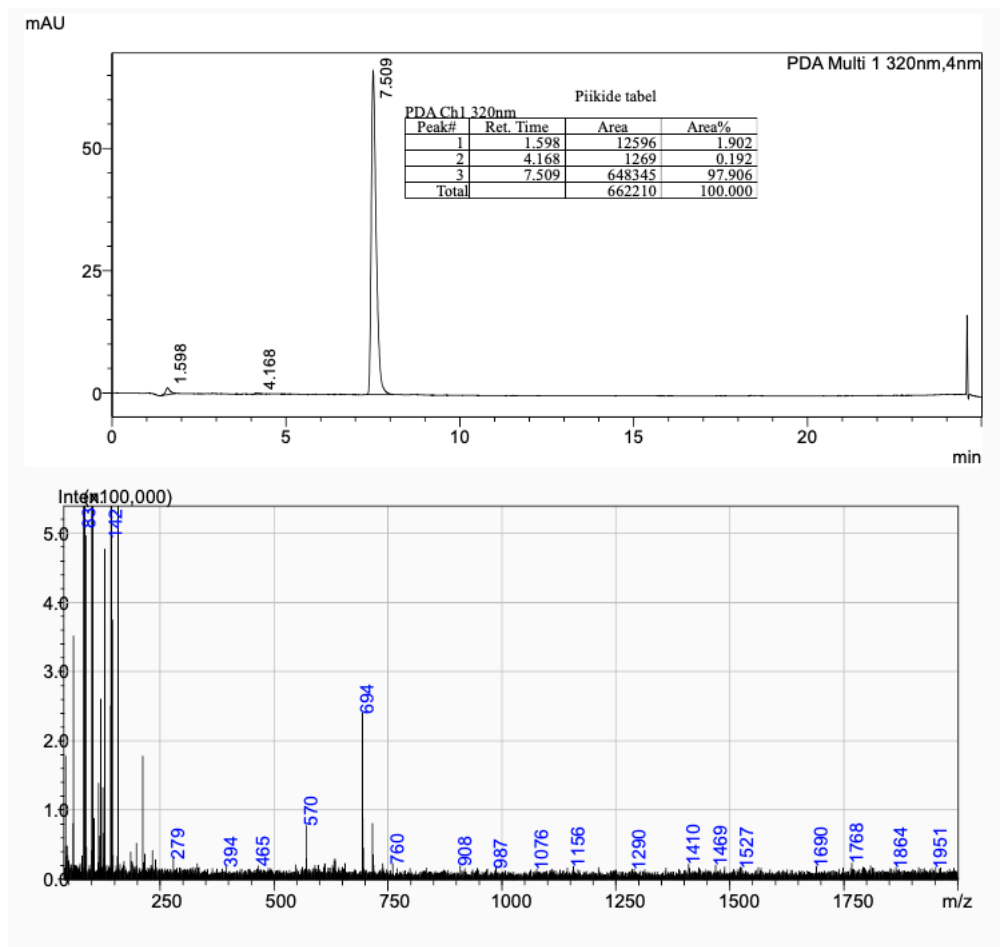
Lisa 17. ARC-807 structuur.



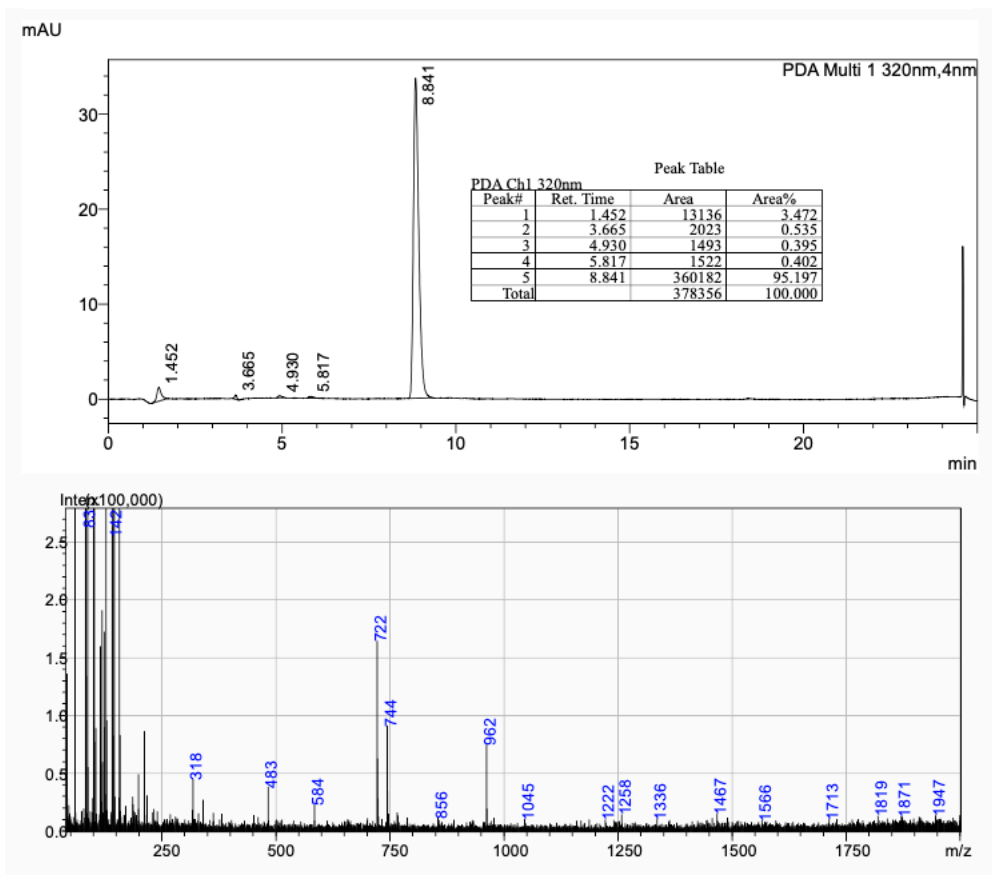
Lisa 18. ARC-808 structuur.



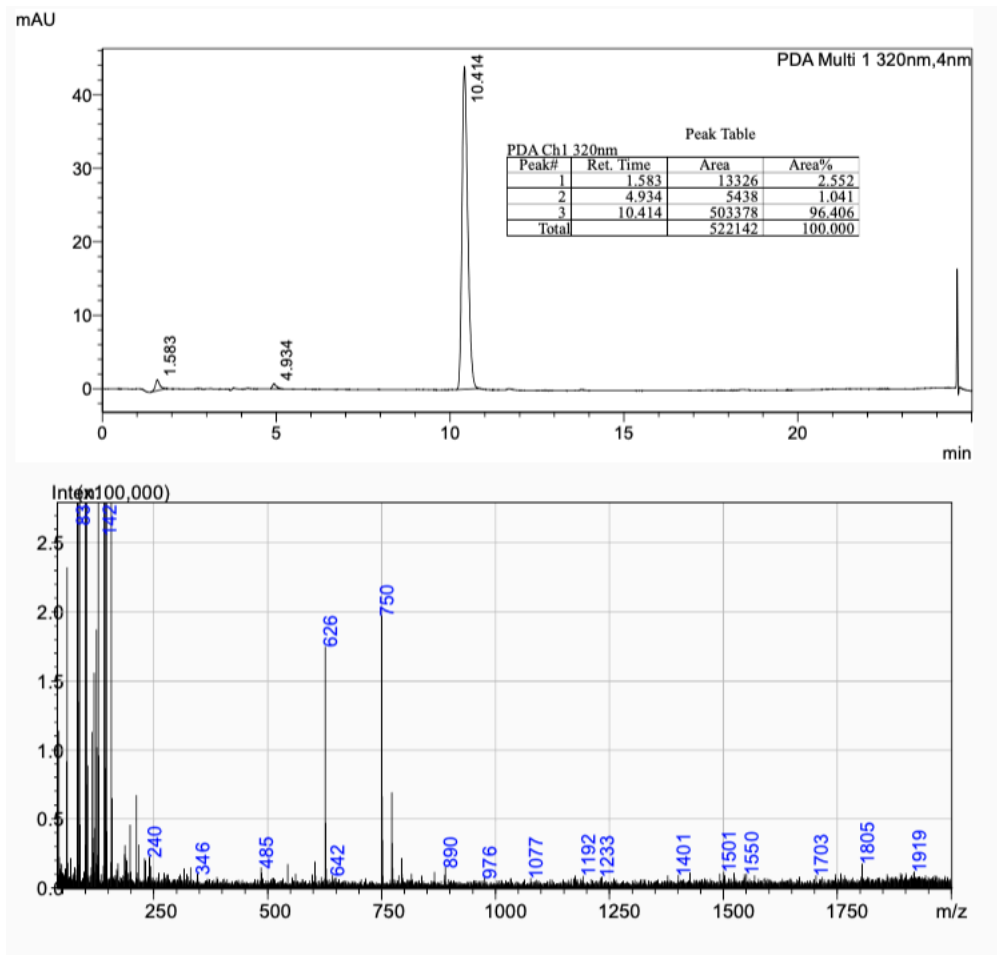
Lisa 19. ARC-800 HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



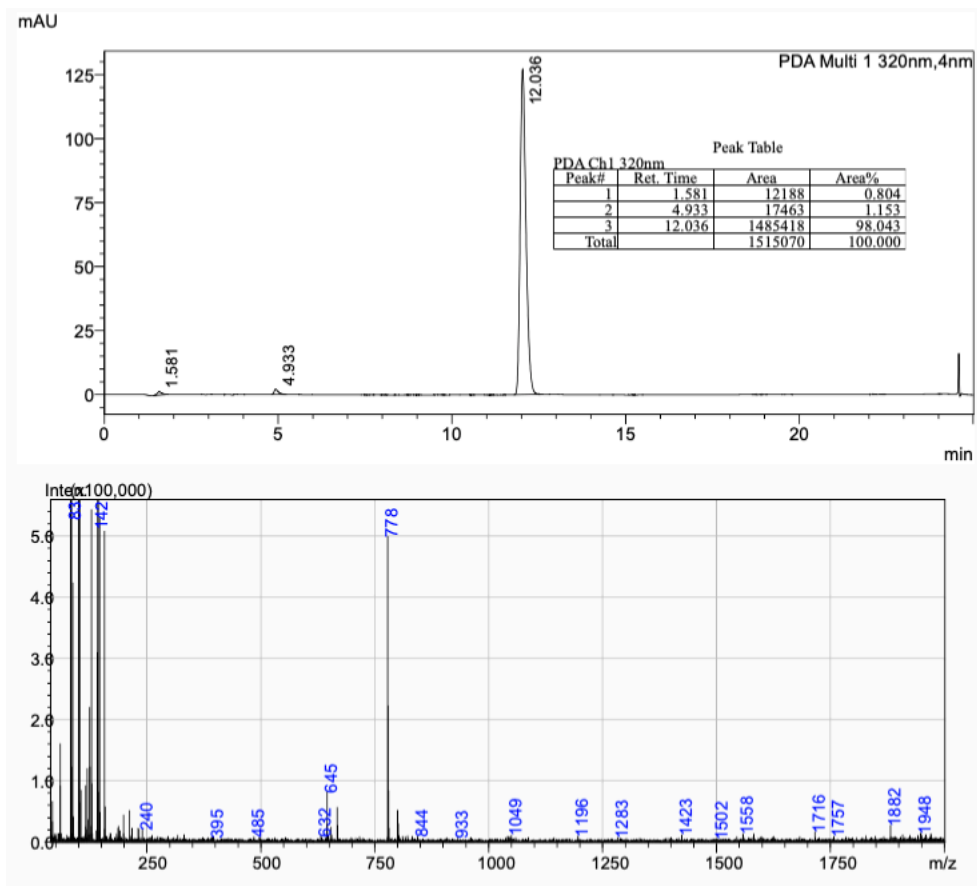
Lisa 20. ARC-801 HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



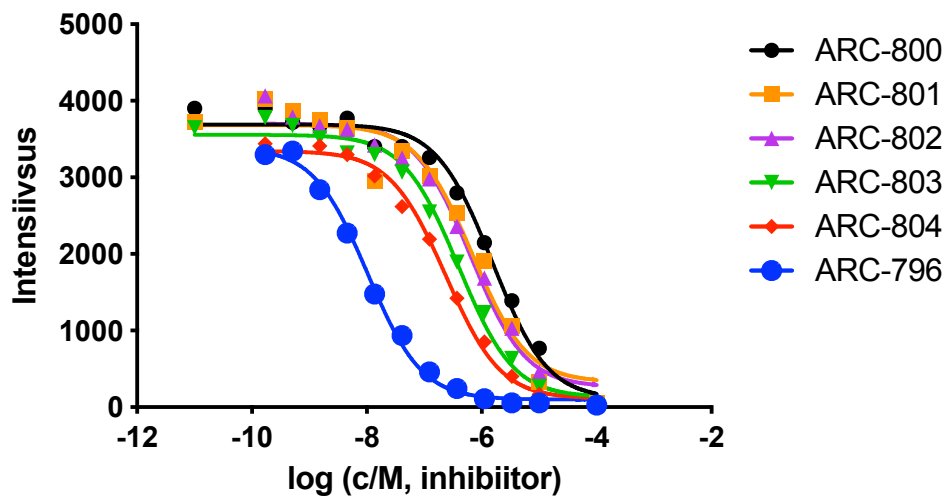
Lisa 21. ARC-802 HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



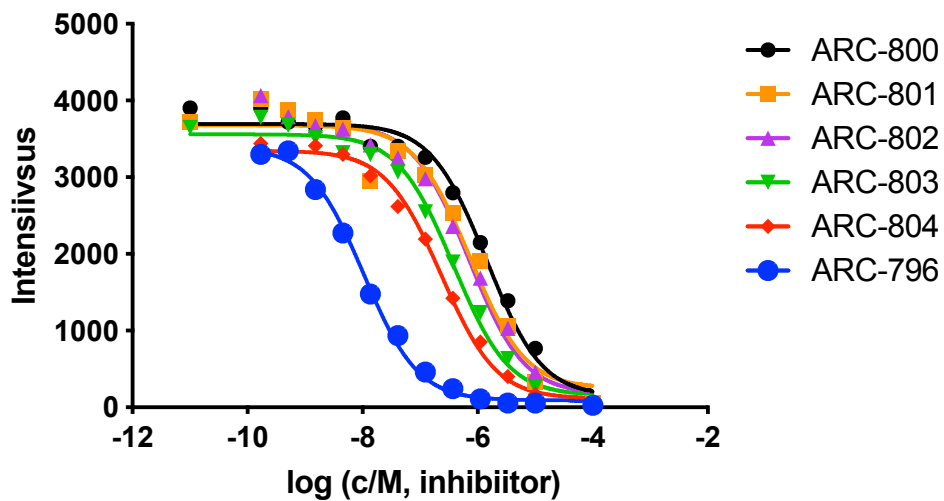
Lisa 22. ARC-803 HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



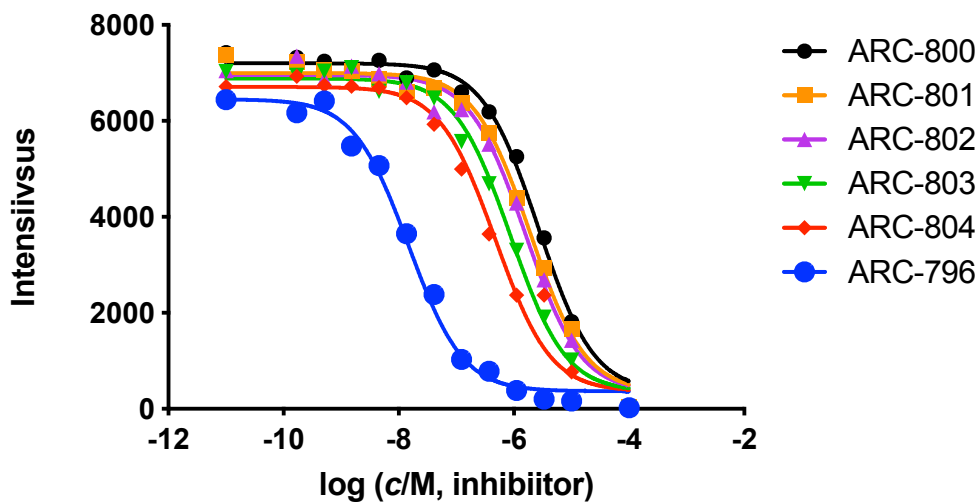
Lisa 23. ARC-804 HPLC-MS andmed. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



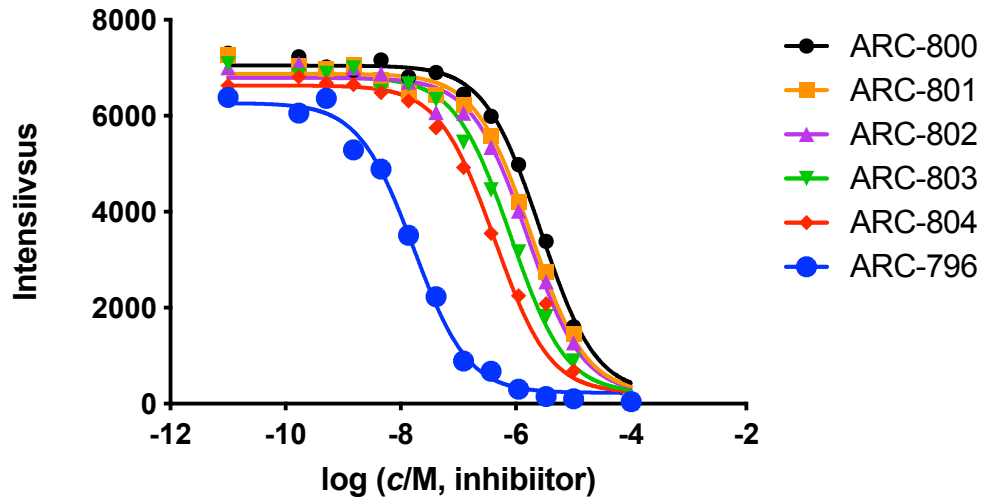
Lisa 24. ARC-800-ARC-804 väljatõrjumiskatsete esimene paralleel pärast 30 min inkubatsiooni, Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



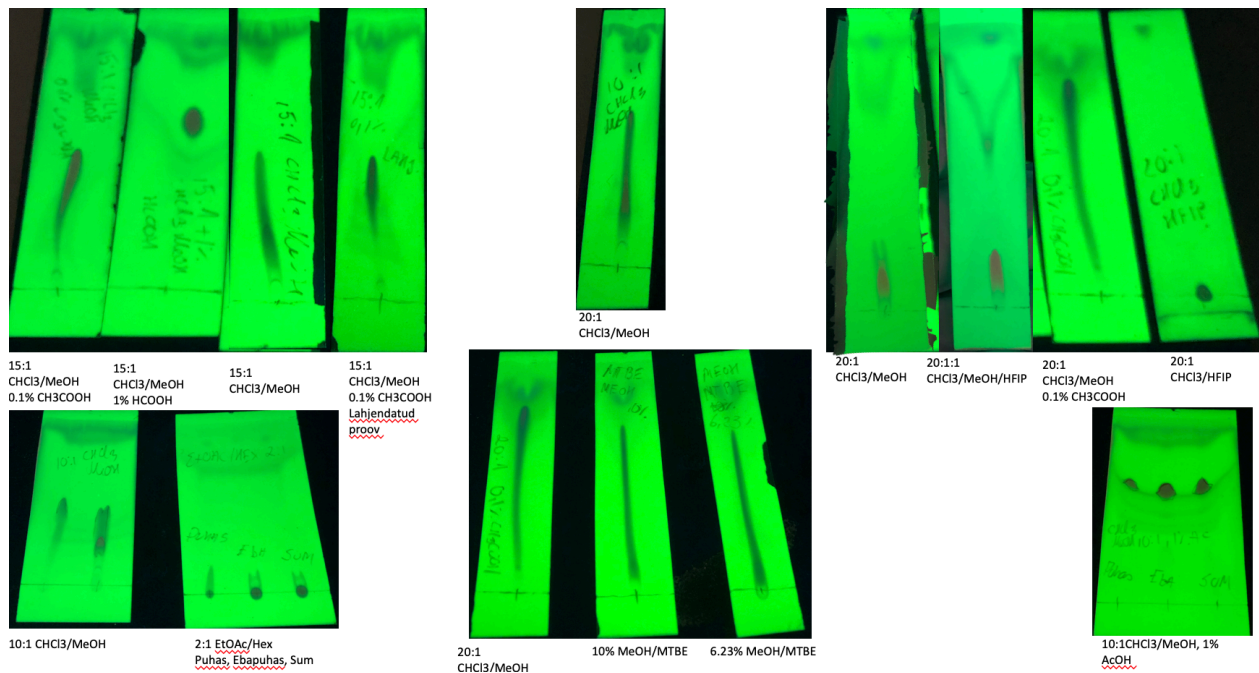
Lisa 25. ARC-800-ARC-804 väljatõrjumiskatsete esimene paralleel pärast 1 h inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



Lisa 26. ARC-800-ARC-804 väljatõrjumiskatsete teine paralleel pärast 30 min inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



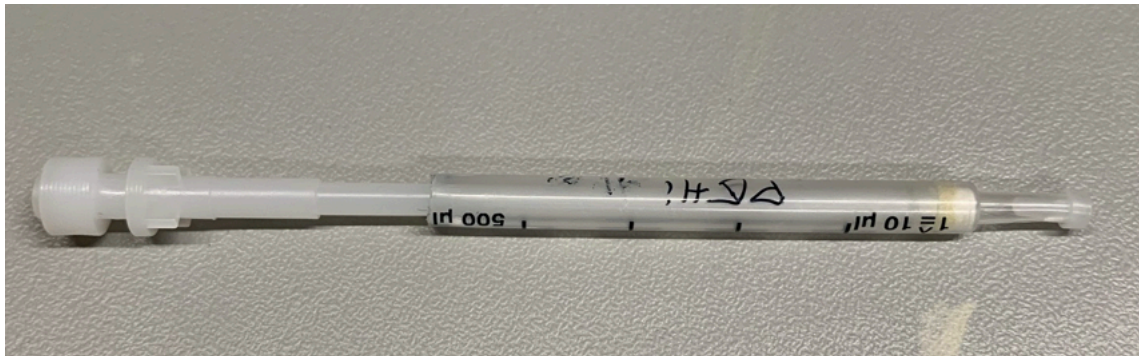
Lisa 27. ARC-800-ARC-804 väljatõrjumiskatsete teine paralleel pärast 1 h inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



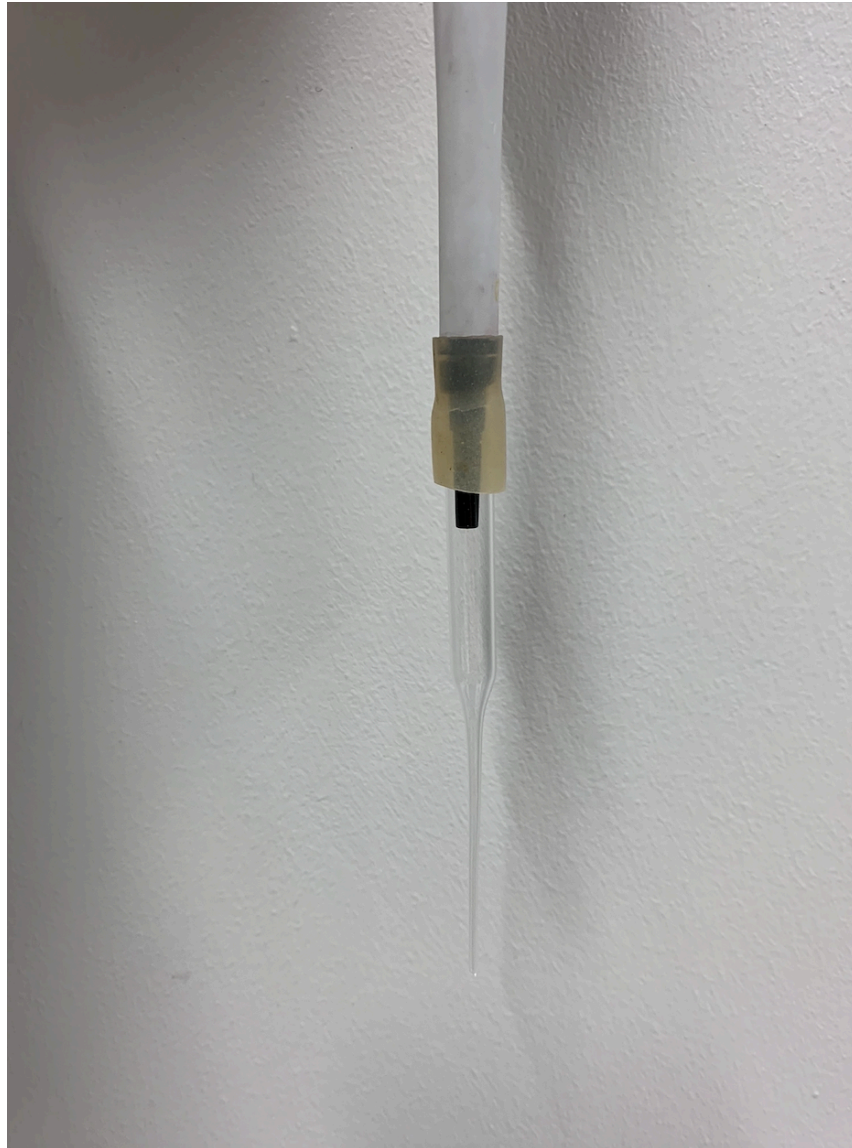
Lisa 28. Eluendi optimeerimine.



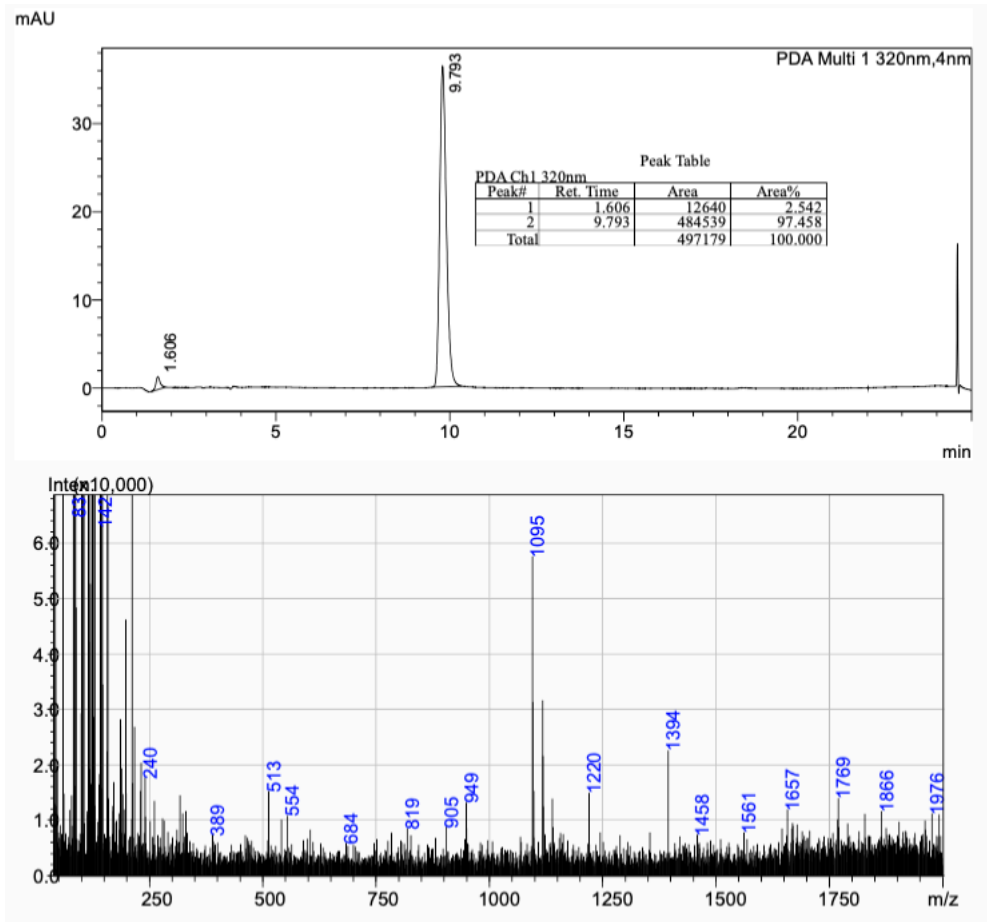
Lisa 29. Katsetatud sünteesinõu.



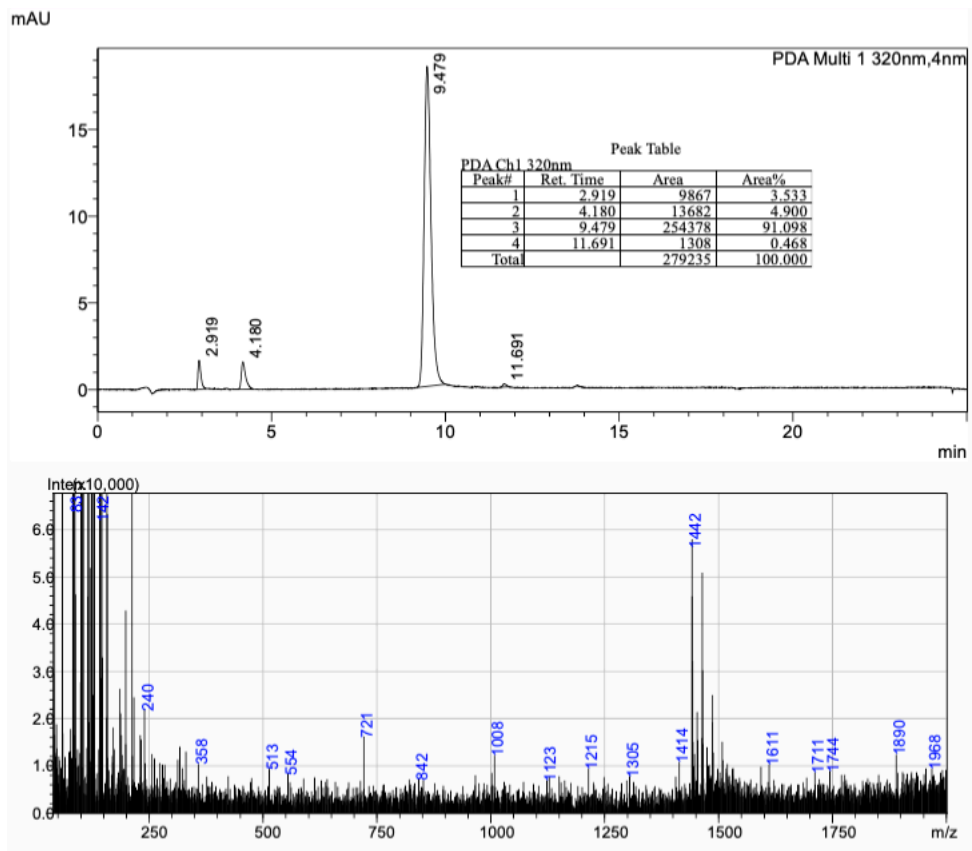
Lisa 30. Kasutusele võetud sünteesinõu.



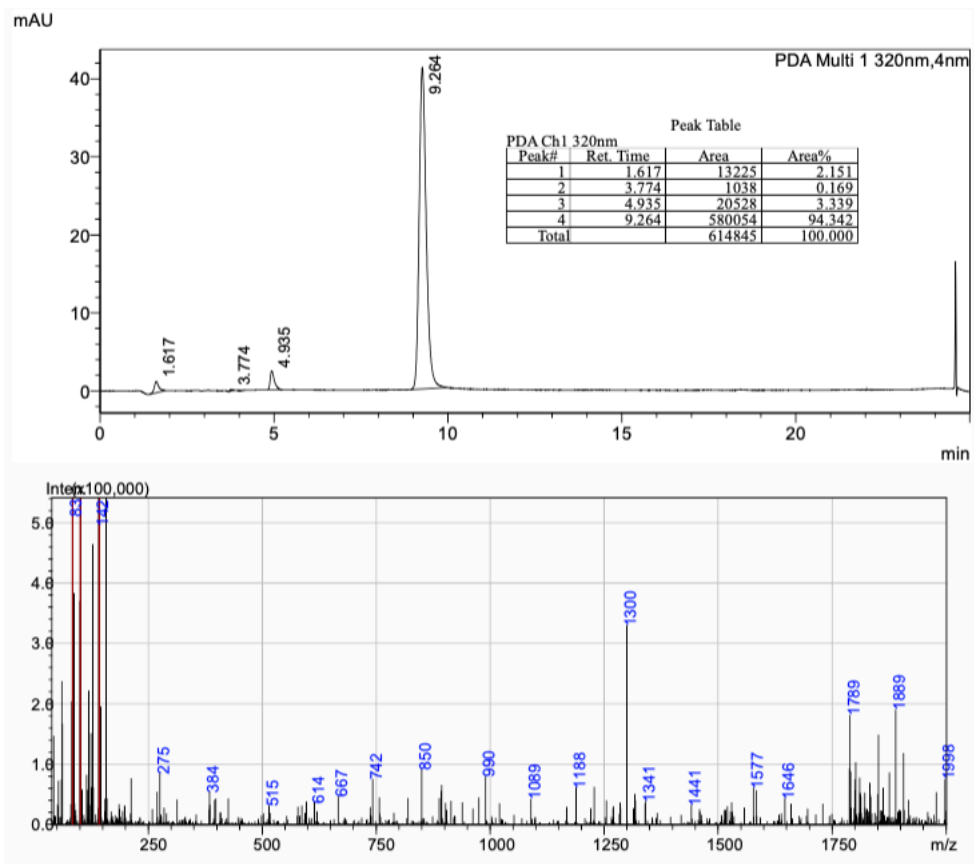
Lisa 31. Modifitseeritud pipetiotsik Pasteuri pipetist vaigususpensiooni eraldamiseks.



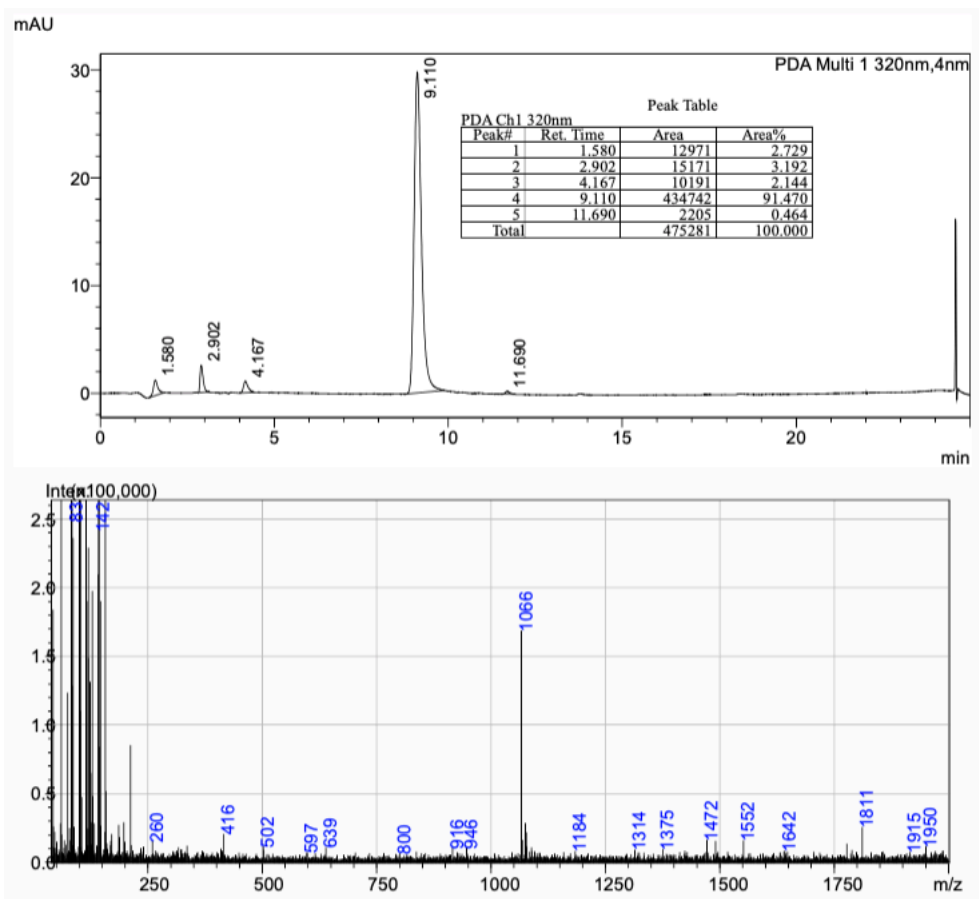
Lisa 32. ARC-805 massispekter. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



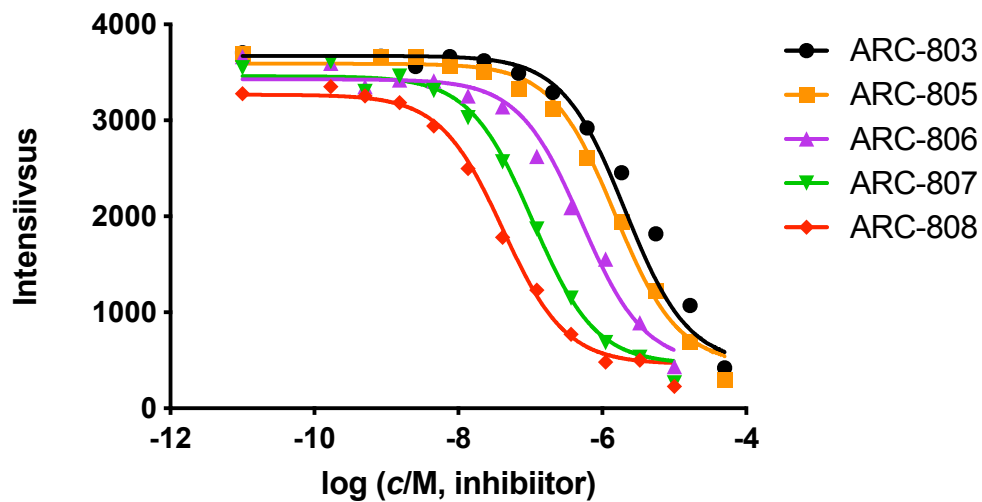
Lisa 33. ARC-806 massispekter. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



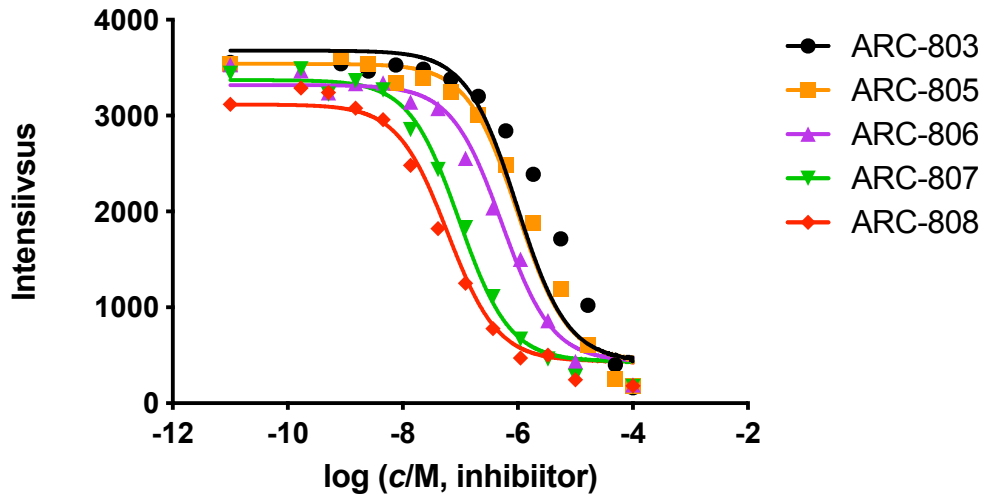
Lisa 34. ARC-807 massispekter. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



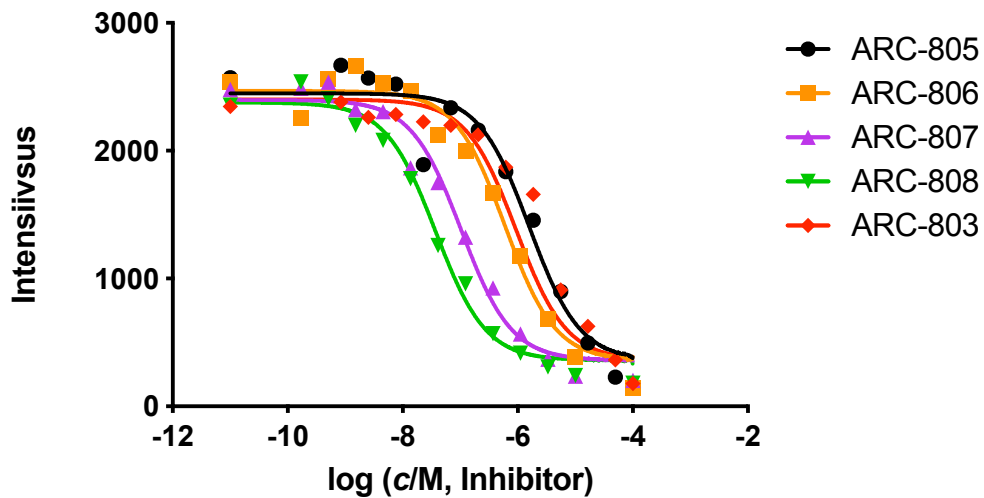
Lisa 35. ARC-808 massispekter. ACN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% ACN/20 min.



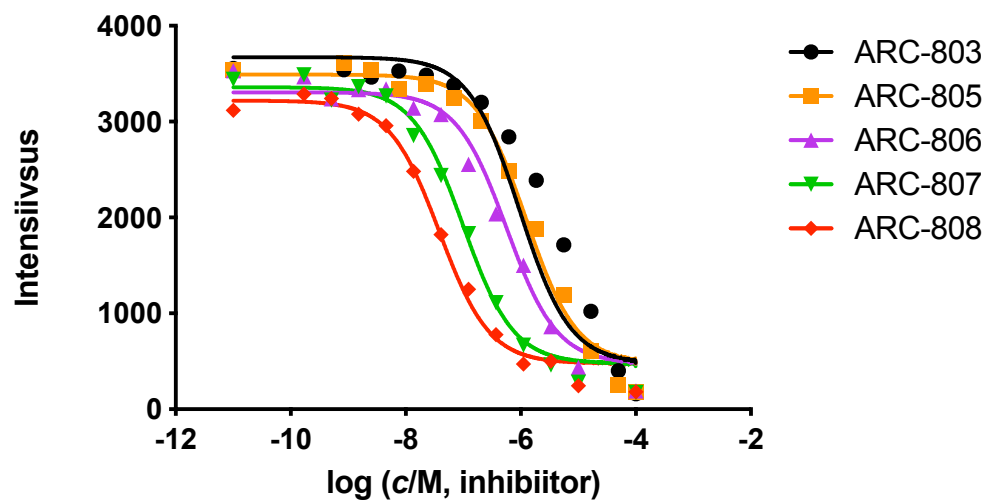
Lisa 36. ARC-803, ARC-805-ARC-808 väljatõrjumiskatsete esimene paralleel pärast 30 min inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



Lisa 37. ARC-803, ARC-805-ARC-808 väljatõrjumiskatsete esimene paralleel pärast 1 h inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



Lisa 38. ARC-803, ARC-805-ARC-808 väljatõrjumiskatsete teine paralleel pärast 30 min inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



Lisa 39. ARC-803, ARC-805-ARC-808 väljatõrjumiskatsete teine paralleel pärast 1 h inkubatsiooni. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina,

Kaijus Janis

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose Tiasooli tsükli sisaldavate bisubstraatsete proteiinkinaasi CK2 inhibiitorite arendus

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on

Kaido Viht

(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 litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kaijus Janis

28.05.20