

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Eva Lea Jääger

**Selenofeeni ja deasapuriini sisaldava ühendi süntees  
proteiinkinaaside fotoluminestsentssondide arendamiseks**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Tanel Sõrmus, MSc

Kaido Viht, PhD

Tartu 2021

## **Infoleht**

### **Selenofeeni ja deasapuriini sisaldava ühendi süntees proteiinkinaaside fotoluminestantsentssondide arendamiseks**

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad organismis fosforüülimisreaktsiooni ja reguleerivad seeläbi väga paljusid rakkudes toimuvaid protsesse. Nende liigaktiivsust seostatakse tõsiste haiguste, sealhulgas vähi ja diabeediga, mistõttu on proteiinkinaasid hetkel ravimiarenduse üks põhilisi sihtmärke. Proteiinkinaaside mõjutamiseks arendatakse inhibiitoreid, mida saab kasutada erinevates katsesüsteemides.

Bakalaureusetöö eesmärk oli sünteesida 7-deasapuriini ja selenofeeni sisaldav ühend, mida saab kasutada bisubstraatse proteiinkinaasi inhibiitori sünteesiks. Seleeni sisaldavate heterotsüklitega inhibiitoritel on iseloomulikud fotoluminestantsomadused, mis võimaldavad nende seondumist ensüümile luminomeetriliselt mõõta. Töös töötati välja sünteesirada 7-deasapuriini ja selenofeeni sisaldava ühendi valmistamiseks.

**Märksõnad:** orgaaniline süntees, ensümolooia, optilised materjalid

**CERCS** klassifikatsioon: P390 orgaaniline keemia; P310 proteiinid, ensümolooia; T151 optilised materjalid.

### **Synthesis of a compound containing selenophene and deazapurine for the development of photoluminescent probes of protein kinases**

Protein kinases are enzymes that catalyze the phosphorylation reaction in various organisms and thereby regulate many cell processes. Their overexpression and dysregulation is associated with serious diseases, such as cancer and diabetes, therefore protein kinases have become one of the most studied targets of pharmaceutical research. Various inhibitors are developed for the regulation and analysis of protein kinases.

The aim of this work was to synthesize a compound containing 7-deazapurine and selenophene that could be used as a building block for the synthesis of a novel bisubstrate inhibitor of protein kinases. Inhibitors comprising a heterocycle with a selenium atom have exhibited intense long-lifetime photoluminescence, which enables the use of luminometric assays for estimating the binding of the inhibitor to the enzyme. Three different synthesis routes were applied, one of which afforded the desired compound.

**Keywords:** organic synthesis, enzymology, optic materials

## Kasutatud lühendid

Lühend	Eestikeelne vaste	Ingliskeelne vaste
AHJ	aminohappejääk	<i>amino acid residue</i>
ARC	adenosiini-oligoarginiini konjugaat või sellega analoogne ühend; üldtermin TÜ meditsiinilise keemia uurimisrühmas arendatavatele PK inhibiitoritele	<i>adenosine-oligoarginine conjugate</i>
ATP	adenosiin-5'-trifosfaat	<i>adenosine 5'-triphosphate</i>
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül-	<i>tert-butyloxycarbonyl-</i>
cAMP	3',5'-tsükliline adenosiinmonofosfaat	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>
CK2	proteiinkinaas CK2	<i>protein kinase CK2</i>
DBU	1,8-diasabitsüklo[5.4.0]undek-7-een	<i>1,8-diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-ene</i>
DCM	diklormetaan	<i>dichloromethane</i>
DMAP	4-dimetüülaminopüridiin	<i>4-dimethylaminopyridine</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetüülformamiid	<i>N,N-dimethylformamide</i>
DMSO	dimetüülsulfoksiid	<i>dimethylsulfoxide</i>
dppf	1,1'-bis(difenüülfosfino)ferrotseen	<i>1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene</i>
EtOAc	etüülatsetaat	<i>ethyl acetate</i>
ESI	elektropihustusionisatsioon	<i>electrospray ionization</i>
FRET	Försteri tüüpi energia ülekanne	<i>Förster-type resonance energy transfer</i>
HPLC-MS	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia-massspektromeetria	<i>High performance liquid chromatography–mass spectrometry</i>
ITDB	2-isopropoksü-4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan	<i>2-isopropoxy-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane</i>
MTBE	metüül- <i>tert</i> -butüüleeter	<i>methyl tert-butyl ether</i>
NBS	<i>N</i> -bromosuktsiinimiid	<i>N-bromosuccinimide</i>
Pin	pinakoolijääk	<i>pinacol (residue)</i>
PK	proteiinkinaas	<i>protein kinase</i>

PKA	proteiinkinaas A; cAMP-sõltuv proteiinkinaas	<i>protein kinase A</i>
PKB	proteiinkinaas B	<i>protein kinase B</i>
PKC	proteiinkinaas C	<i>protein kinase C</i>
PKI	proteiinkinaasi inhibiitor	<i>protein kinase inhibitor</i>
ROCK	Rho-seotud proteiinkinaas	<i>Rho-associated protein kinase</i>
TAMRA	tetrametüülrhodamiin	<i>tetramethylrhodamine</i>
TFA	trifluoroetaanhape	<i>trifluoroacetic acid</i>
THF	tetrahüdrofuraan	<i>tetrahydrofuran</i>
TLC	õhukese kihi kromatograafia	<i>thin layer chromatography</i>
TMEDA	tetrametüületüendiamiin	<i>tetramethylethylenediamine</i>
TMR	tuumamagnetresonantsspektroskoopia	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
TMSOTf	trimetüüsilüültrifluorometaansulfonaat	<i>trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate</i>
Tol	tolueen	<i>toluene</i>
UV	ultraviolett-	<i>ultraviolet</i>

# Sisukord

Sissejuhatus .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Proteiinkinaasid .....	7
1.2. Proteiinkinaaside inhibiitorid .....	8
1.2.1. ARC-tüüpi inhibiitorid .....	10
1.3. Fotoluminestsents .....	11
1.4. Proteiinkinaaside fotoluminestsentssondid.....	12
1.5. Suzuki sidestusreaktsioon.....	13
2. Eksperimentaalne osa .....	15
2.1. Aparatuur ja töövahendid .....	15
2.2. Kasutatud kemikaalid .....	15
2.3 Sünteesieeskirjad .....	16
2.3.1. Sünteesirada I .....	16
2.3.2. Sünteesirada II.....	17
2.3.3. Sünteesirada III .....	23
3. Tulemused ja arutelu .....	26
3.1. Sünteesirada I .....	28
3.2. Sünteesirada II .....	28
3.3. Sünteesirada III.....	30
3.4. Lõpphinnang ja töö edasiarendused .....	32
Kokkuvõte .....	33
Summary .....	34
Kasutatud kirjandus.....	35
Lisad .....	38

## Sissejuhatus

Proteiinkinaasid (PK-d) katalüüsivad organismis valkude fosforüülimisreaktsiooni, millel on oluline roll rakkude elutsüklis. PK-de häired omavad organismis ulatuslikku mõju, näiteks seostatakse neid vähktõve, diabeedi ja põletikuliste haigustega. PK-de aktiivsuse reguleerimiseks töötatakse 1980. aastate algusest saati välja inhibiitoreid, neist 65 on 2021. aasta maikuu seisuga ravimitena heaks kiidetud.

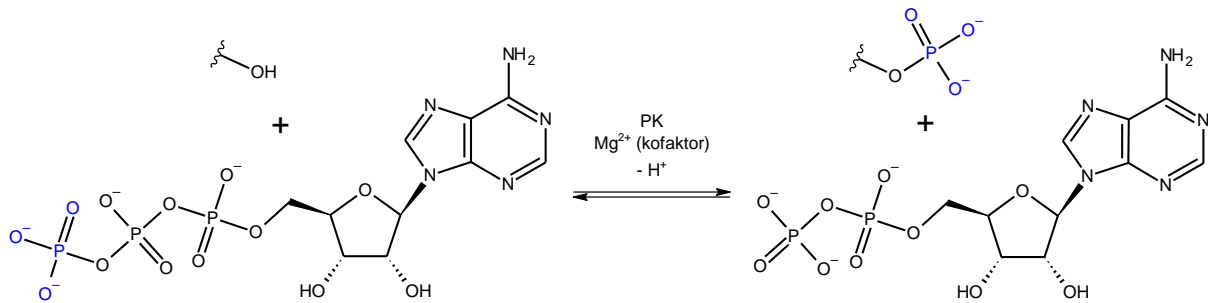
Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas arendatakse bisubstraatseid ATP-analoogi ja peptiidahelat sisaldavaid PK inhibiitoreid (PKI) (adenosiini ja oligoarginiini konjugaadid, lühend ARC). Uurimisrühmas avaldati 2017. aastal artikkel, kus kirjeldati inhibiitori ARC-1137 kõrget afiinsust PK suhtes. ARC-1137 ATP-analoog on 7-deasapuriini ja tiofeenituuma sisaldav ühend, mis panustab inhibiitori-PK kompleksi UV-kiirgusega kiiritamisel tekkivasse aeglase emissiooniga luminesentsi. Koosmõjus ARC-le konjugeeritud fluorestsentsvärviga võimaldab see inhibiitori jaoks kasutada luminesentsil põhinevaid analüüsimeetodeid.

Bakalaureusetöö eesmärk oli sünteesida 7-deasapuriini ja selenofeeni sisaldav ühend, mida oleks võimalik kasutada ARC-1137 selenofeenanalooži sünteesiks. Väävelaromaatsete struktuuridega võrreldes on aromaateid seleeni heterotsükleid sisaldavate molekulide kiiritamisel UV-kiirgusega täheldatud intensiivsemat luminesentskiirgust, mis võimaldab luua tundlikumaid katsesüsteeme. Selenofeeni sisaldavate ühendite sünteesi on võrdlemisi vähe uuritud, lisaks on neid kommertsiaalselt vähe saadaval. Seetõttu esineb vajadus efektiivsete selenofeeni derivaatide sünteesimeetodite järele.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Proteiinkinaasid

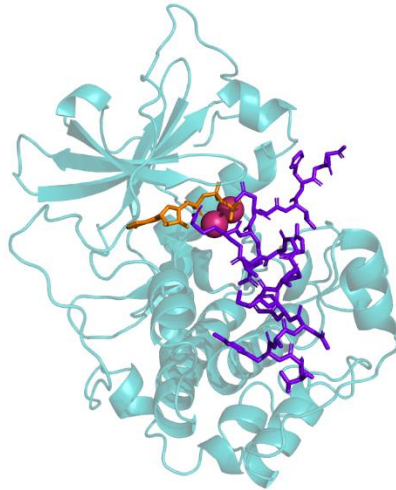
Proteiinkinaasid (PK-d) on olulise tähtsusega ensüümid, mis katalüüsivad  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekandmist adenosiin-5'-trifosfaadilt (ATP) substraatvalgu seriini-, treoniini- või türosiinijääkide hüdroksüülrühmale. Seda protsessi nimetatakse fosforüülimiseks (**Joonis 1**).



*Joonis 1. PK poolt katalüüsitud ATP  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekanne substraatvalgu hüdroksüülrühmale.*

Valkude fosforüülimine on pöörduv. Fosforüülrühma hüdrolüütilist eemaldamist katalüüsivad fosfataasid. Füsioloogilisel pH-l kahekordse negatiivse laenguga fosforüülrühma lisandumisel valgu struktuuri muutub valgu aktiivsus ja stabiilsus. Näiteks mõjutab fosforüülimine valkude konformatsiooni, teiste valkudega tekkivaid vesiniksidemeid ja seeläbi valgu äratundmist teiste valkude poolt [1]. Nende muutuste kaudu reguleerivad PK-d omakorda rakkude jagunemist, toitainete metabolismi, RNA ja valkude sünteesi, apoptoosi ja DNA parandamist [2]. Seega on fosforüülimistasakaaludel ja PK-del organismis keskne regulatoorne roll.

Praeguseks on inimese genoomis tuvastatud 540 PK-sid kodeerivat geeni, nende kogumikku nimetatakse inimese kinoomiks [3]. Erinevaid PK-sid seob asjaolu, et neil on kuni 250 aminohappejäägist (AHJ) koosnev, küllaltki konserveerunud järjestusega katalüütiline alaühik. Katalüütiline alaühik koosneb kahest osast: peamiselt  $\alpha$ -heeliksitest koosnevast C-terminaalsest sagarast ja peamiselt  $\beta$ -ahelatest koosnevast N-terminaalsest sagarast. ATP sidumistasku asub nende sagarate vahel olevas õõnsuses. Fosforüülimise eelduseks on ATP ja substraatvalgu samaaegsel seondumisel tekkiv PK:ATP:valk-kolmikkompleks, mida stabiliseerivad kofaktorina  $Mg^{2+}$ -ioonid [2] (**Joonis 2**).



*Joonis 2. PKA katalüütiline alaühik, kus oranžina on tähistatud sidumistaskus paiknev ATP ja lilla värviga valgu sidumispiirkonda seondunud peptiidinhibiitor PKI (5-24, TTYADFLASGRTGRRNAIHD), roosad sfäärid tähistavad magneesiumiioone (PDB 1ATP) [4].*

Selleks, et fosforüülimine saaks toimuda, peab fosforüülitav AHJ substraatvalgu peptiidahelas paiknema konkreetsetes positsioonis. Fosforüülimisel interakteeruvad lisaks substraatvalgu OH-rühmale ja PK aktiivtsentrite ka kummagi molekuli teised piirkonnad. Sobivat AHJ-ide järjestust, mille PK ära tunneb, nimetatakse konsensusjärjestuseks. See võib eri PK-de lõikes palju varieeruda, mis võimaldab muuhulgas PK-de klassifitseerimise basofiilseteks ja atsidoofiilseteks. Basofiilsed PK-d interakteeruvad valkudega, mille konsensusjärjestuses on fosforüülitava jäägi naabruses füsioloogilise pH tingimustes positiivselt laetud AHJ-d, nagu lüsiin, arginiin või histidiin. Atsidoofiilsed PK-d tunnevad ära konsensusjärjestuse, kus on negatiivselt laetud AHJ-d, nagu glutamaat või aspartaat. Näiteks basofiilse proteiinkinaas A (PKA) konsensusjärjestus on R-(R/K)-X-(S/T)-B, atsidoofiilse PK kaseiinkinaas 2 (CK2) konsensusjärjestus on X-(S/T)-X-(E/D)-X, kus B on mistahes hüdrofoobne AHJ, S/T on fosforüülitav AHJ ja X mistahes AHJ [5].

PK-de normipärasest kõrgem aktiivsus võib põhjustada paljusid haigusi, sealhulgas vähkasvajaid, diabeeti, südamehaigusi ja neurodegeneratiivseid haigusi [3, 6]. Ulatusliku rolli tõttu inimorganismis on PK-d peamised sihtmärgid ligikaudu ühele neljandikule käimasolevatest ravimiuuringutest [7].

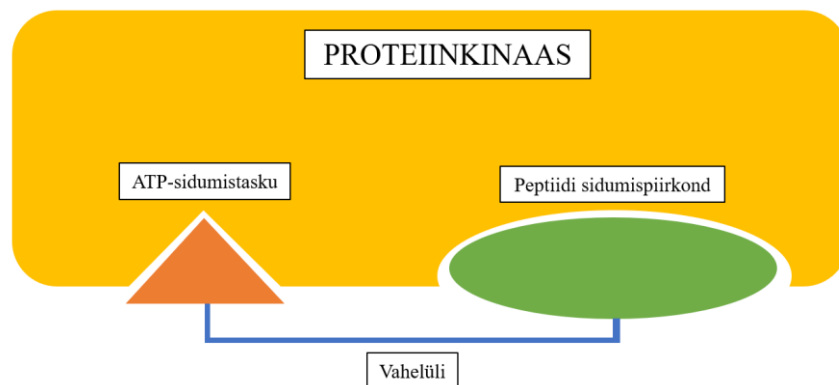
## 1.2. Proteiinkinaaside inhibiitorid

PK-de kontsentratsiooni, omaduste ja signaaliradade uurimiseks ja ravimikandidaatideks kasutatakse ja arendatakse erinevaid PK-de aktiivsust pärssivaid biomolekule, mida nimetatakse PK-de inhibiitoriteks (PKI). Inhibiitor võib seonduda PK ATP-d siduvasse

taskusse, peptiidi sidumiskiirkonda, mõlemasse korraga või interakteeruda mõne muu PK piirkonnaga. Seondumise alusel klassifitseeritakse PKI-d kuude eri rühma. I ja II tüüpi PKI-d seonduvad vastavalt aktiveeritud või aktiveerimata PK konformatsiooni ATP-d siduvasse taskusse. III ja IV tüüpi PKI-d on allosteerilised, st ei seonu ensüümi aktiivtsentrisse. III tüüpi inhibiitorid seonduvad allosteerilisse tsentrisse ATP-siduva tasku kõrval, IV tüüpi inhibiitorid aga aktiivtsentrist kaugemal ja ühe võimaliku mehhanismina stabiliseerivad sel viisil PK inaktiivset vormi. V tüüpi PKI-d on bivalentsed, st seonduvad PK kahe erineva piirkonnaga. I kuni V tüüpi PKI-d on kõik pöörduvad inhibiitorid. VI tüüpi inhibiitorid on pöördumatud ja seonduvad PK-le kovalentselt [8].

Esimesena ravimina kasutusele võetud PK inhibiitor on imatiniib (Glivec), mis ilmus turule 2001. aastal. Algselt kroonilise müeloidse leukeemia vastu välja töötatud ravimit kasutatakse praeguseks kaheksa eri tüüpi kasvajaga seotud haiguse ravimiseks. 2021. aasta 30. märtsi seisuga on USA Toidu- ja Raviamet ravimitena heaks kiitnud 65 PKI-d, millest pea kõik on I või II tüüpi inhibiitorid [8, 9].

PK inhibiitorite arendamise põhilisi võtmeküsimusi on konkreetse PK suhtes selektiivsuse saavutamine. Eri PK-de ATP-taskud on olulisel määral konserveerunud, st koosnevad sarnasest AHJ järjestusest, ja enamik ATP taskule suunatud PKI-sid inhibeerivad seetõttu enam kui üht PK-d [10]. Inimgenoom kodeerib lisaks PK-dele veel üle 2500 valgu, mis ATP või teiste puriini derivaatidega interakteeruvad [11]. Sellised võimalikud lisasihtmärgid võivad kaasa tuua PKI soovimatuid toimeid organismis. Lisaks peab inhibiitor konkureerima kõrge ATP kontsentratsiooniga rakus (2–4 mM) [1]. Peptiidi sidumiskiirkond pakub sihtmärgina rohkem mänguruumi, kuid sel juhul tuleb sellele suunatud inhibiitori afiinsuse tõstmiseks pikendada selle peptiidahelat, mis jällegi raskendab ühendi transporti rakku. Nende probleemide ühe lahendusena arendataksegi V tüüpi ehk bisubstraatseid inhibiitoreid, mis sisaldavad nii ATP-konkurentset rühma kui ka substraatvalku jäljendavat peptiidahelat [12] (**Joonis 3**).

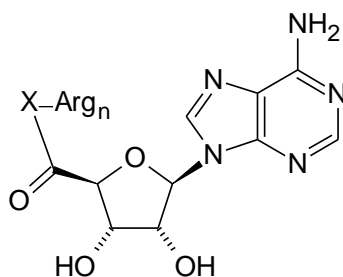


**Joonis 3.** Bisubstraatse inhibiitori seondumise põhimõtteline skeem.

Bisubstraatsete inhibiitorite peamine eelis on väga kõrge potentsiaalne afiinsus. Kummagi fragmendi struktuuri saab ka mõnevõrra varieerida, sest kuigi ühe modifikatsiooni tagajärjel võib afiinsus langeda, ei ole kahe fragmendi koosmõju oluliselt mõjutatud. Bisubstraatsete inhibiitorite põhine lähenemine võimaldab ka juba olemasolevate monosubstraatsete inhibiitorite selektiivsust parandada [13].

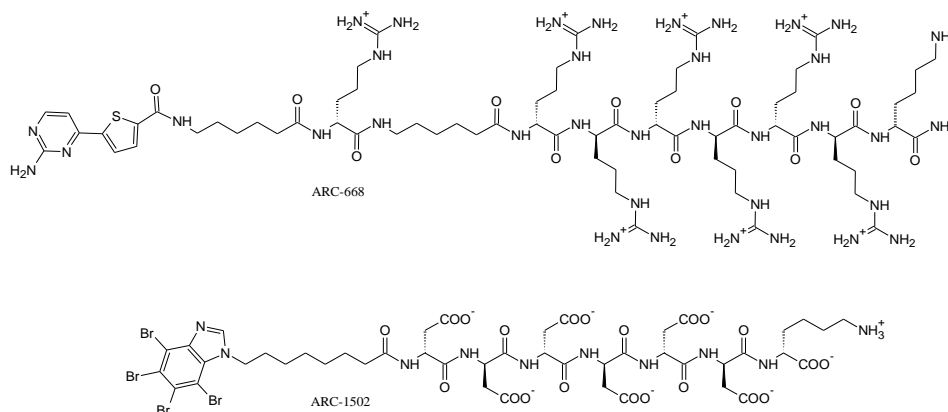
### 1.2.1. ARC-tüüpi inhibiitorid

Tartu Ülikooli meditsiinilise keemia uurimisrühmas on välja töötatud bisubstraatsed ARC-tüüpi (ingl *adenosine-oligoarginine conjugate*) inhibiitorid. Algselt vahelülga seotud adenosini- ja oligoarginiinipõhiseid ühendeid (**Joonis 4**) on alates nende avaldamisest 1999. aastal [14] palju edasi arendatud ning lühendiga ARC nimetatakse laialdasemalt TÜ meditsiinilise keemia uurimisrühmas välja töötatud bisubstraatseid inhibiitoreid.



**Joonis 4.** TÜ meditsiinilise keemia uurimisrühmas esimesena avaldatud ARC-tüüpi inhibiitori üldskeem, kus X tähistab vahelüli.

Peptiidfragmendina kasutati ja kasutatakse oligoarginiini seetõttu, et esimesed ARC-d töötati välja basofiilsele PKA-le. Lisaks PKA-le on samas uurimisrühmas arendatud inhibiitoreid ka PK-dele nagu näiteks CK2, PKB, PKC ja ROCK [12, 15]. Mõningate näidetena, ARC-668 omab selektiivsust basofiilsele PKA-le ja sisaldab peptiidahelas 6 arginiinijääki [16]. ARC-1502 on suunatud atsidoofiilsele kinaasile CK2 ja selle peptiidahel koosneb valdavalt aspartaadijääkidest [15] (**Joonis 5**).

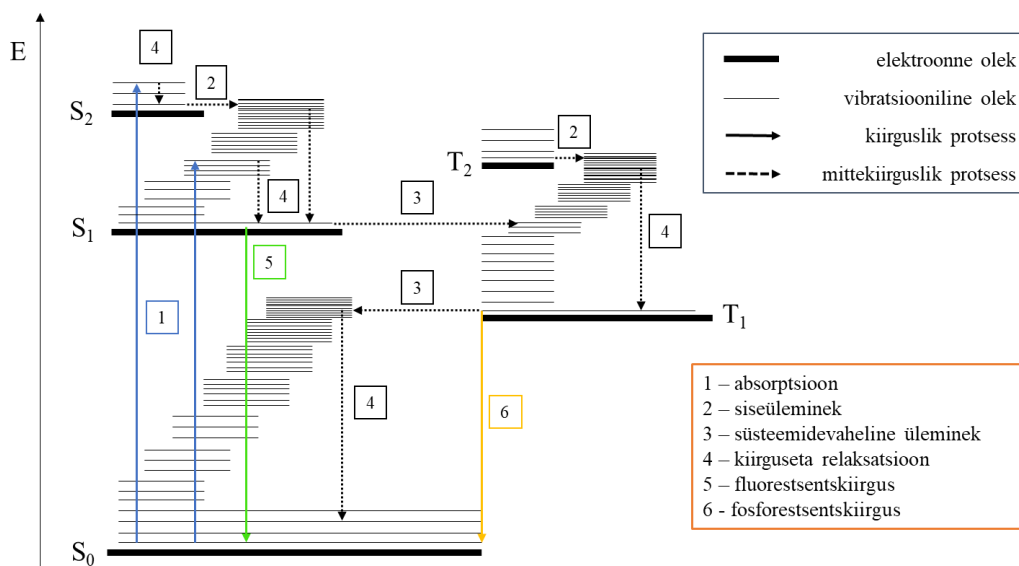


**Joonis 5.** Näiteid ARC-tüüpi inhibiitoritest.

ARC-de derivatiseerimine fluorestsentsmärgistega annab võimaluse sihtmärkkinaaside aktiivsuse, PKI-de omaduste ja teiste valkudevaheliste interaktsioonide luminomeetriliseks mõõtmiseks. Seda on täpsemalt kirjeldatud peatükis „Fotoluminestsentssondid“.

### 1.3. Fotoluminestsents

Aatomite või molekulidega võivad toimuda erinevad fotofüüsikalised protsessid (**Joonis 6**).



**Joonis 6.** Jablonski diagramm [17], mis kujutab molekuli energeetilisi olekuid ja võimalikke fotofüüsikalisi protsesse.

Elektromagnetkiirguse absorptsiooni (**1**) kaudu ergastatakse molekul singletsest põhiolekust (S<sub>0</sub>) ergastatud olekutesse (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>). Ergastatud olekus molekuliga võib toimuda siseüleminek (**2**), mille puhul säilib multipletsus, aga energia kantakse üle näiteks mõnele teisele vibratsioonilisele olekule. Süsteemidevahelise ülemineku (**3**) korral muutub ergastatud oleku multipletsus (singletsest olekust tripletsesse või vastupidi). Lisaks võib toimuda kiirguseta relaksatsioon (**4**), kui molekul annab lisaenergia ümbritsevasse keskkonda (st teistele molekulidele). **2**, **3** ja **4** on kõik mittekiirguslikud protsessid.

Luminestsents on ergastatud osakesest spontaanne valguskiirguse emissioon. Selle alaliik, fotoluminestsents, mis eeldab ergastumist footoni neeldumise teel, jagatakse fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks [18]. Fluorestsents (**5**) tekib molekuli naasmisel ergastatud olekust põhiolekusse nii, et spinni multipletsus ei muutu (enamjaolt S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub> → S<sub>0</sub>). Tegemist on väga kiire protsessiga (10<sup>-9</sup> kuni 10<sup>-7</sup> s). Tripletses olekus ergastatud molekul võib samuti naasta olekusse S<sub>0</sub> ja seda nimetatakse fosforestsentsiks (**6**). Kuna spinn-üleminek on väikese tõenäosusega toimuv protsess, on fosforestsents fluorestsentsist palju pikema elueaga (10<sup>-6</sup> kuni 10<sup>-3</sup> s) [19].

Kõigi nimetatud protsessidega konkureerivad samaaegselt ka molekuli lagunemine või luminesentsi kustumine kokkupõrkel teiste molekulidega (ingl *quenching*). Üks peamisi selliseid kustutajaid on molekulaarne hapnik. Hapniku ja ergastatud olekus fluorofoori kokkupõrkel kandub fluorofoori energia hapnikule, mille tõttu footonit ei eraldu ja luminesentskiirgust ei esine [17].

#### **1.4. Proteiinkinaaside fotoluminesentssondid**

Üks võimalus PKI-de efektiivsuse mõõtmiseks on ensüümkinetiline katse, kus hinnatakse PKI mõju inhibeeritava PK poolt katalüüsitava fosforüülimisreaktsioonile. See analüüsimeetod nõuab aga küllaltki palju aega ja spetsiaalseid substraate. Teine alternatiiv on otseselt või kaudselt inhibiitori afiinsuse hindamine. Näiteks ARC peptiidahelale on võimalik lisada fluorestsentsmärgis, mis ei mõjuta inhibiitori afiinsust, kuid võimaldab selle uurimiseks kasutada luminesentsil põhinevaid meetodeid. Meetodi aluseks on PK-le seondumata ja seondunud sondi erinevad optilised omadused [16, 20]. Märgistamata inhibiitori seondumist ensüümile saab hinnata katsetes, kus uuritav inhibiitor ja fluorestsentsmärgistatud inhibiitor seonduvad konkureerivalt ensüümi samasse sidumiskohta. Esimese fluorestsentsmärgisega ARC-sondi ARC-583 C-terminali oli lisatud fluorestsentsvärv 5-TAMRA ja see avaldati 2009. aastal [21].

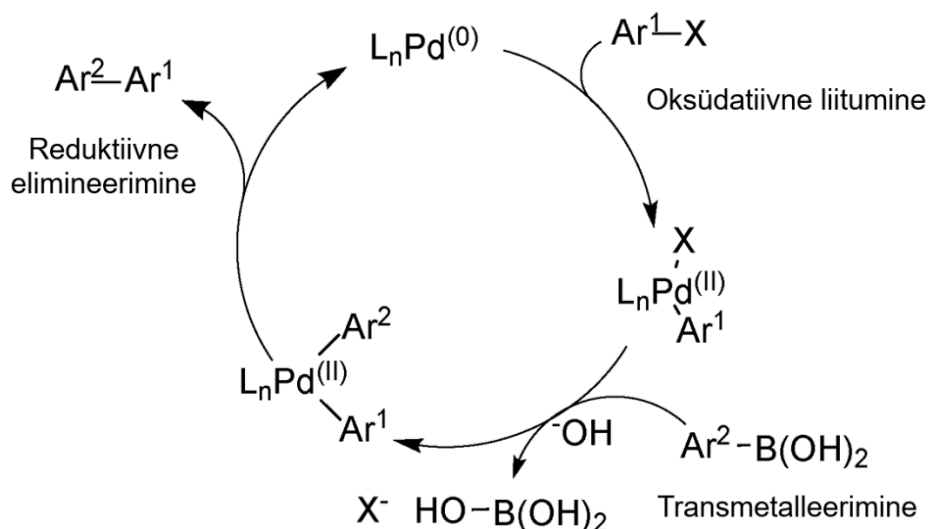
ARC-inhibiitorid, mille ATP-taskusse seonduvas struktuuriosas on väävli või seleeni aatomit sisaldavad heterotsükliid, hakkavad PK-ga seondumise järgselt UV-kiirgusega (UV-A alas) ergastades emiteerima aeglaselt kustuvat ehk pika elueaga fotoluminesentskiirgust. Selliseid fotoluminesentssonde nimetatakse ARC-Lum sondideks [16, 22]. Kui ARC-Lum molekul sisaldab lisaks veel mõnda fluorofoori (ergastamisel valgust kiirgavat ühendit), saab toimuda Försteri tüüpi energia ülekanne (FRET) ergastatud väävli või seleeni heterotsükliidilise süsteemi (doonorkromofoor) ja fluorestsentsmärgise vahel (aktseptorkromofoor). PK ATP-taskus paikneva ARC-Lum heterotsükliidilise süsteemi UV-A kiirguse sähvatusel ergastades on võimalik registreerida aeglaselt kustuv ( $\tau = 20\text{--}50 \mu\text{s}$ ) emissioonikiirgus fluorestsentsmärgisele iseloomulikul lainepikkusel (nt 5-TAMRA puhul 590 nm) [16].

PK-le seondunud ARC-Lum sondi fluorestsentssignaal on palju intensiivsem kui seondumata vormil, sest seondunult PK ATP-taskusse on UV-kiirgusega ergastatud tiofeeni või selenofeeni fragmenti sisaldaval ARC-Lum inhibiitoril väiksem võimalus energia ära anda soojusliikumisenä või teistele molekulidele.

ARC-Lum-tüüpi ühendite luminesentsi mõõtmiseks on mugav kasutada aeg-lahutatud luminesentsi (ingl *time-gated luminescence*) mõõtmisrežiimi. Pärast valgusega kiiritamist lühiajalise ergastuspulsiga hakatakse luminesentssignaali mõõtma teatud viivituse (~50  $\mu$ s) järel. Viivituse jooksul kustub kiiritamiseks kasutatava lambi enda kiirgus ja taustfluorestsents, mida põhjustavad teised lahuses olevad ühendid, anuma materjal jne [16]. Meetod eeldab, et uuritavate ühendite luminesents oleks piisavalt pika elueaga ( $\mu$ s või ms skaalas), sest vastasel korral ei ole seda pärast viivituse lõppu enam võimalik registreerida.

## 1.5. Suzuki sidestusreaktsioon

Suzuki sidestusreaktsioon (tuntud ka Suzuki-Miyaura reaktsioonina) on üks sagedamini kasutatavatest sünteesimeetoditest süsinik-süsinik-sidemete moodustamiseks. Esimest korda 1979. aastal kirjanduses mainitud [23] ja tänaseks põhjalikult uuritud ja optimeeritud sünteesimeetod võimaldab pallaadiumkatalüsaatori abil aluselises keskkonnas ristsidestada organoboroonhappeid või nende derivaate ja organohaliide. Reaktsiooni kulgemisel eristatakse kolme etappi: oksüdatiivne liitumine, transmetalleerimine ja reduktiivne elimineerimine (**Joonis 7**). Oksüdatiivse liitumise käigus liitub haliid pallaadiumkompleksiga ning pallaadium oksüdeerub. Transmetalleerimise käigus asendatakse pallaadiumile liitunud halogeeniioon boroonhapest pärineva rühmaga. Viimaks tekib reduktiivsel elimineerumisel uus C–C-side ning pallaadium redutseerub [24].



**Joonis 7.** Suzuki reaktsiooni üldskeem kolme määrava etapiga: a) oksüdatiivne liitumine, b) transmetalleerimine, c) reduktiivne elimineerimine. Joonis kohandatud allikast [25].

Meetodi eelisteks on pehmed reaktsioonitingimused, mittemürgised vaheühendid ja kõrvalsaadused, lai lähteainete ja pallaadiumkatalüsaatori ligandide valik, kõrge regio- ja

stereoselektiivsus. Lisaks ei vaja reaktsioon täielikult veevaba keskkonda ning vesi on koguni üks võimalikest solventidest [25].

Reaktsiooni kiirust määrab kõige enam oksüdatiivne liitumine, olenevalt kasutatavast haliidist (kiiruse kahanevas järjekorras  $I > Br \gg Cl$ ) [26]. Transmetalleerimise etapis on oluline roll reaktsioonis kasutataval alusel. Kõige tõenäolisema mehhanismi kohaselt liitub alus boroonhappe derivaadile ja muudab selle reaktiivsemaks vormiks, boronaadiks, mis seejärel asendab esimeses etapis tekkinud pallaadiumikompleksis halogeeniaatomi oma asendusrühmaga [25]. Näited tüüpilisematest alustest on  $Na_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Cs_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $K_3PO_4$ ,  $CsF$  [25–27]. Aluse valik sõltub olulisel määral sidestatavate ühendite vastupidavusest aluste suhtes [27].

Suzuki reaktsiooniks sobivad mitmesugused pallaadium(0)-ligand-kompleksid või pallaadium(II)-ühendid, mida on võimalik ligandidega redutseerida. Kõige sagedamini kasutatav on nelja trifenüülfosfinorühmaga  $Pd(PPh_3)_4$ , aga lisaks sellele on ka  $PdCl_2(PPh_3)_2$ ,  $Pd(OAc)_2$  ja  $Pd(t-Bu_3P)_2$  efektiivsed katalüsaatorid [26].

Suzuki reaktsiooni käigus konkureerivad ristsidestusega homosidestus (st side tekib kahe sama struktuuriga lähteaine molekuli vahele) ja lähte-boroonhappe deboroneerimine [25].

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Aparatuur ja töövahendid

Tuumamagnetresonantsanalüüs (TMR) mõõdeti spektrometriga Bruker Avance III HD.  $^1\text{H}$  TMR spektrid mõõdeti sagedusel 700 MHz,  $^{13}\text{C}$  TMR spektrid sagedusel 176 MHz. Sisestandard oli tetrametüülsilaan ( $\text{Me}_4\text{Si}$ ).

Õhukese kihi kromatograafia (TLC) tegemiseks kasutati fluorestsentsindikaatoriga Macherey-Nagel silikageeliplaat Alugram® SIL G/UV 254.

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) analüüsiks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Pöördfaaskromatograafia jaoks kasutati kolonni Phenomenex Gemini  $\text{C}_{18}$  (250×4,6 mm), osakese suurusega 5  $\mu\text{m}$ . Elueerimiseks kasutati  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (0,1% TFA) gradienti voolukiirusega 1 ml/min. Kromatogramme detekteeriti diodrividetektori, fluorestsentsdetektori ja mass-spektrometriga. Massispektreid mõõdeti positiivse ionisatsiooni mõõtmisrežiimis mass-spektrometriga Shimadzu ESI LC/MS-2020.

Kõik reaktsioonid, kus kasutati *n*-butüüllitiumit, viidi läbi eelnevalt leegis kuumutatud ja lämmastikuvoorus jahutatud kolbides.

### 2.2. Kasutatud kemikaalid

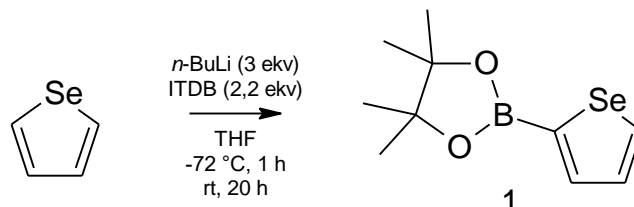
Reagendid soetati järgmistest ettevõtetest: selenofeen, NBS,  $\text{Boc}_2\text{O}$ , 2M *n*-BuLi tsükloheksaanis,  $\text{Pd}(\text{t-Bu}_3\text{P})_2$  – Aldrich; 2,4-dinitrofenüülhüdraasiin, THF, MeOH, heksaan, MTBE, DCM,  $\text{NaHCO}_3$  – Sigma-Aldrich; 1,4-dioksaan, DBU, TMSOTf, püridiin – Fluka;  $\text{Et}_2\text{O}$ , *t*-BuOH, MeCN – Honeywell; TMEDA – Reanal;  $\text{N}_2$ , Ar ja tahke  $\text{CO}_2$  – Linde AG; selenofeen-2-karbaldehüüd – TCI ja ABCR; 5-(4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan-2-üül)-selenofeen – ABCR;  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , TFA – Fisher Scientific; NaOH, EtOAc,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , HCl, NaCl,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , toluen – Lachner;  $\text{MgSO}_4$  – Mallinckrodt; DMF,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  – Merck; DMAP – Advanced Chemtech;  $\text{B}(\text{OMe})_3$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  – Acros;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – Reakhim; 6-bromo-7-deasapuriin, silikageel, CuCl, dppf – Fluorochem; CsF – Novosibirskii Zavod Redkih Metallov; 2-isopropoksü-4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan – Alfa Aesar; tseliit – Roth;  $\text{CDCl}_3$  + 0,1%  $\text{Me}_4\text{Si}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$  + 0,1%  $\text{Me}_4\text{Si}$  – Deutero. 2,2-dimetüül-1,3-bis[(trimetüülsilüül)oksü]propan oli varasemalt samas laboris sünteesitud.

DCM kuivatati molekulaarsõeltel (3 Å) minimaalselt üleöö. Kuiv THF destilleeriti naatriumi/bensofenooneketüüli radikaaliooni juuresolekul.

## 2.3 Sünteesieeskirjad

### 2.3.1. Sünteesirada I

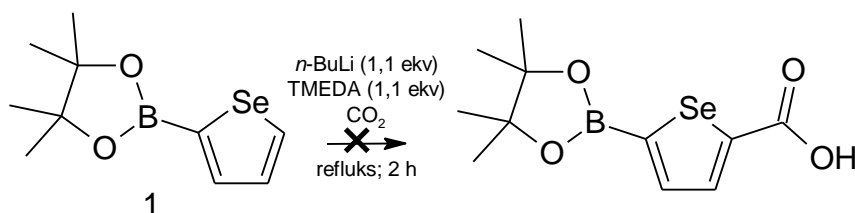
#### I) 5-(4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan-2-üül)-selenofeen (ühend 1):



Selenofeen (100 mg; 0,76 mmol; 1 ekv) lahustati kuivatatud THF-is (3 ml) Ar keskkonnas ja jahutati EtOH/tahke CO<sub>2</sub> vannis temperatuurini –72 °C. Teflontihendiga klaassüstla abil lisati tilkhaaval 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (1,15 ml; 2,29 mmol; 3 ekv) ja segu segati 30 min. Seejärel lasti segul soojeneda toatemperatuurile, segati veel 30 min ja viidi uuesti temperatuurile –72 °C. Lisati tilkhaaval 2-isopropoksü-4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan (ITDB; 343 µl; 1,68 mmol; 2,2 ekv) ja segu segati toatemperatuuril 20 tundi [28]. Reaktsioon peatati 1M HCl lisamisega (1,5 ml), saadud vee kihti ekstraheeriti etüülatsetaadiga (EtOAc; 3 × 2 ml). Kogutud EtOAc ekstrakti kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga, filtreeriti ja solvent eemaldati vaakumiga. Toorsegu puhastati kolonnkromatograafia abil (eluent 100% CHCl<sub>3</sub>) ja ühend **1** eraldati kollaste kristallidena (220 mg; saagis 96%).

Ühend **1**: TMR δ<sub>1H</sub> (700 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 8,36 (1H; d; *J* = 4,9 Hz; H<sub>ar</sub>); 7,94 (1H; d; *J* = 3,5 Hz; H<sub>ar</sub>); 7,45 (1H; dd; *J*<sub>1</sub> = 4,55 Hz; *J*<sub>2</sub> = 3,5 Hz; H<sub>ar</sub>); 1,34 (12H; s; —(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). TMR δ<sub>13C</sub> (176 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 139,6; 137,7; 131,0; 84,1; 24,8 (Lisa 6).

#### II) 5-(4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan-2-üül)-selenofeeni ja CO<sub>2</sub> reaktsioon:



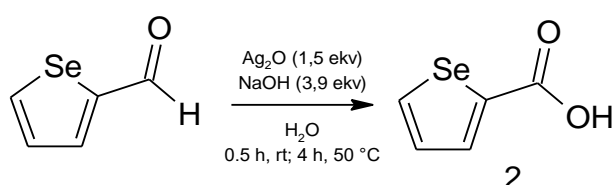
Reaktsioon viidi paralleelselt läbi nii autori poolt sünteesitud kui ka kommertsiaalsest allikast soetatud lähteainega **1**. Kõik teised tingimused olid kummaski paralleelis identsed.

Ühend **1** (50 mg; 0,20 mmol; 1 ekv) lahustati dietüüleeris (750 µl) Ar keskkonnas, lisati tetrametüületüleendiamiin (TMEDA; 33 µl; 0,22 mmol; 1,1 ekv) ja 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (107 µl; 0,22 mmol; 1,1 ekv) [29]. Segu keedeti püstjahutiga 2 tundi ning

seejärel jahutati atsetooni/tahke CO<sub>2</sub> vannis temperatuurini –78 °C. Seejärel lisati reaktsioonisegu kolvis tilkhaaval tahke CO<sub>2</sub> tükkidele. Pärast kogu CO<sub>2</sub> sublimeerumist peatati reaktsioon 1M NaOH lisamisega (1 ml), viidi 1M HCl lisamisega pH-ni 2, saadud vee kihti ekstraheeriti Et<sub>2</sub>O-ga (3 × 2 ml). Et<sub>2</sub>O ekstrakti pesti küllastatud NaCl lahusega, kuivatati MgSO<sub>4</sub>-ga, filtreeriti ja solvent eemaldati vaakumiga. Saadud ainet analüüsiti TMR abil, kus olid tuvastatavad vaid lähteaine **1** signaalid, kuid puudus karboksüülrühmale iseloomulik keemiline nihe.

### 2.3.2. Sünteesirada II

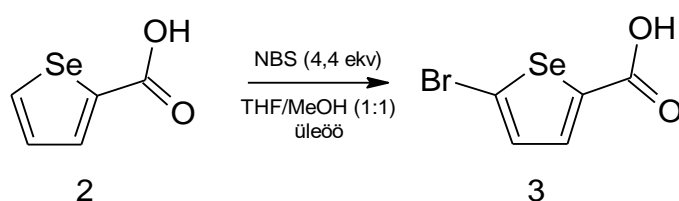
#### I) Selenofeen-2-karboksüülhape (ühend 2):



NaOH (195 mg; 4,9 mmol; 3,9 ekv) ja Ag<sub>2</sub>O (437 mg; 1,9 mmol; 1,5 ekv) lisati vette (4 ml) toatemperatuuril ja segati 15 min. Seejärel lisati selenofeen-2-karbaldehüüd (200 mg; 1,3 mmol; 1 ekv) ja reaktsioonisegu segati toatemperatuuril 30 min ning temperatuuril 50 °C 4 tundi [30]. Reaktsioon peatati HCl 10% lahuse lisamisega (1 ml), reaktsioonisegu ekstraheeriti EtOAc-ga (3 × 2 ml). EtOAc ekstrakti pesti vee ja küllastatud NaCl lahusega ja kuivatati veevaba Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga. Solvent eemaldati vaakumis ja saadi ühend **2** helekollase pulbrina (196 mg; 89%).

**Ühend 2:** TMR δ<sub>1H</sub> (700 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 12,97 (1H; s; —COOH); 8,52 (1H; m; **H<sub>ar</sub>**); 7,94 (1H; m; **H<sub>ar</sub>**); 7,41 (1H; m; **H<sub>ar</sub>**). TMR δ<sub>13C</sub> (176 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 164,7; 140,8; 140,3; 136,1; 131,0 (Lisa 1).

#### II) 5-bromoselenofeen-2-karboksüülhape (ühend 3):

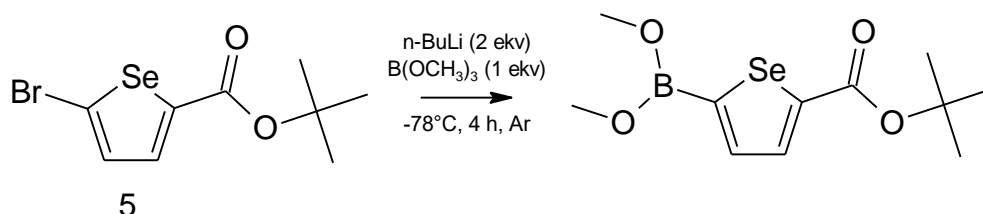


Ühend **2** (50 mg; 0,29 mmol; 1 ekv) lahustati tetrahydrofuraani (THF) ja MeOH (1:1, 3 ml) segus ja lisati *N*-bromosuktsiinimiid (NBS; 224 mg; 1,26 mmol, 4,4 ekv) temperatuuril 0 °C [31]. Segu segati toatemperatuuril üleöö. Lahusti eemaldati vaakumis, tahkele jäägile lisati



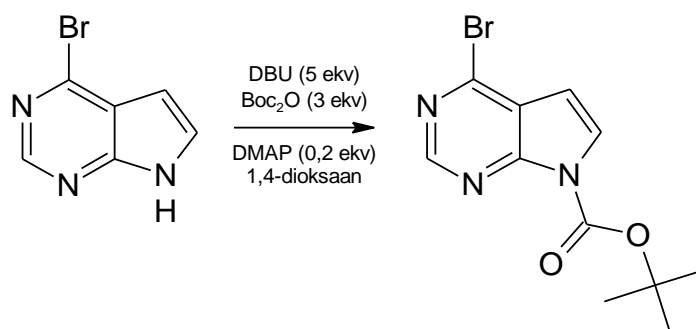
**Ühend 5:** TMR  $\delta_{1H}$  (700 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 7,64 (1H; d;  $J = 4,2$  Hz; **H<sub>ar</sub>**); 7,26 (1H; d;  $J = 3,5$  Hz; **H<sub>ar</sub>**); 1,55 (9H; s; —(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). TMR  $\delta_{13C}$  (176 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 161,8; 142,8; 135,0; 133,8; 123,1; 82,3; 28,2 (Lisa 4).

**V) 2-tert-butüüloksükarbonüül-5-dimetoksuboronatoselenofeen:**



Ühend **5** (15,5 mg; 0,05 mmol; 1 ekv) lahustati kuivatatud THF-is (0,5 ml) Ar keskkonnas. Segu viidi temperatuurile  $-78$  °C (tahke CO<sub>2</sub>/atsetooni vann) ja tilkhaaval lisati 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (*n*-BuLi; 50 µl; 0,1 mmol; 2 ekv). Segu segati 30 min temperatuuril  $-78$  °C, seejärel lisati trimetüülboraat (6 µl; 0,05 mmol; 1 ekv) 0,5 ml THF-is ja segati 3,5 tundi [33]. Reaktsiooni kulgu jälgiti TLC (eluent 4:1 heksaan/EtOAc) abil iga tunni tagant ning täheldati lähteaine hulga vähenemist ja arvatava produkti tekkimist. Pärast 4 tundi peatati reaktsioon 2 ml 5%-lise NH<sub>4</sub>Cl lisamisega, tekkinud vee kihti ekstraheeriti EtOAc-ga (3 × 1 ml), kogutud EtOAc ekstrakti kuivatati veevaba Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga. Pärast lahusti eemaldamist vaakumis oli toorsegu mass 30 mg ja seda prooviti puhastada kolonnkromatograafia abil (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 20:1), kuid õnnestus eraldada ~2 mg lähteainet ja <1 mg oletatavat produkti, mida ei olnud võimalik analüüsida.

**VI) 9-(tert-butüüloksükarbonüül)-6-bromo-7-deasapuriin (ühend 6):**

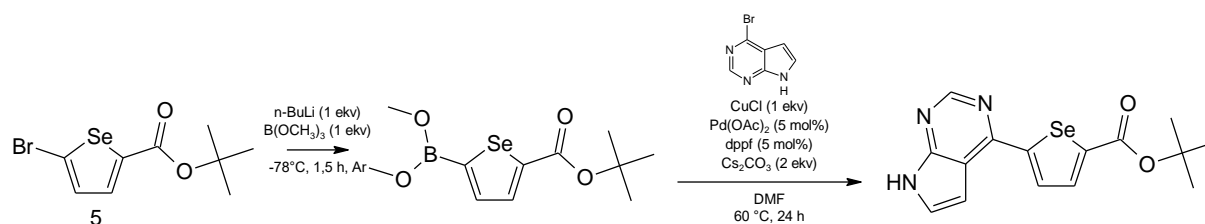


6-bromo-7-deasapuriin (200 mg; 1,01 mmol; 1 ekv), 1,8-diasabitsüklo[5,4,0]undek-7-een (DBU; 755 µl; 5,05 mmol; 5 ekv), DMAP (25 mg; 0,2 mmol; 0,2 ekv) lahustati 1,4-dioksaanis (1 ml) ja segati 10 min. Lisati di-*tert*-butüüldikarbonaat (Boc<sub>2</sub>O; 661 mg; 3,03 mmol; 3 ekv) [34]. Segu segati 48 tundi toatemperatuuril, seejärel lahjendati EtOAc-ga (3 ml) ja lisati 3 ml 20% NaCl lahust. Soolalahust ekstraheeriti EtOAc-ga (3 × 2 ml), saadud EtOAc ekstrakti pesti

küllastunud NaCl lahusega, kuivatati veevaba MgSO<sub>4</sub>-ga, filtreeriti. Lahusti eemaldati vaakumis ja segu puhastati kolonnkromatograafia abil (CHCl<sub>3</sub>/MTBE, 10:1 v/v). Ühend **6** eraldati valge pulbrina (160 mg; 53%).

**Ühend 6:** TMR  $\delta_{1H}$  (700 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 8,79 (1H; s; **H<sub>ar</sub>**); 7,71 (1H; d;  $J = 3,5$  Hz; **H<sub>ar</sub>**); 6,60 (1H; d;  $J = 4,2$  Hz; **H<sub>ar</sub>**); 1,69 (9H; s; —(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). TMR  $\delta_{13C}$  (176 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 152,8; 151,2; 147,0; 144,7; 127,7; 123,2; 104,0; 86,0; 28,0 (Lisa 7).

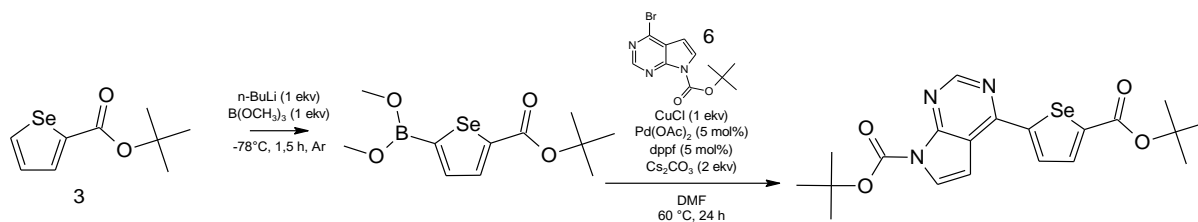
**VIIa) Ühe kolvi 2-tert-butüüloksükarbonüül-5-bromoselenofeeni ja 6-bromo-7-deasapuriini Suzuki sidestusreaktsioon:**



Ühend **5** (100 mg; 0,32 mmol; 1 ekv) lahustati eelnevalt leegis kuivatatud kolvis Ar keskkonnas kuivas THF-is (1 ml). Segu viidi temperatuurile  $-78$  °C (tahke CO<sub>2</sub>/atsetooni vann) ja tilkhaaval lisati 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (161  $\mu$ l; 0,32 mmol; 1 ekv). Pärast 10 min segamist viidi segu temperatuurile  $-40$  °C (CO<sub>2</sub>/MeCN vann) ja segati veel 30 min. Seejärel jahutati segu uuesti temperatuurini  $-78$  °C ja lisati tilkhaaval trimetüülboraat (36  $\mu$ l; 0,32 mmol; 1 ekv). Pärast 10 min segamist lasti segul soojeneda toatemperatuurini 30 min jooksul. Seejärel lisati 6-bromo-7-deasapuriin (64 mg; 0,32 mmol; 1 ekv), CuCl (16 mg; 0,16 mmol; 0,5 ekv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (3,6 mg; 0,02 mmol; 0,05 ekv), 1,1'-bis(difenüülfosfino)ferrotseen (dppf; 9 mg; 0,02 mmol; 0,05 ekv) ja Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (210 mg; 0,65 mmol; 2 ekv) ja dimetüülformamiid (DMF; 2 ml) [35]. Segu segati 24 h temperatuuril 60 °C Ar keskkonnas ja reaktsiooni kulgu jälgiti TLC abil (eluent 4:1 heksaan/EtOAc). Täheledatai lähteainete vähenemist ja tugevalt fluorestseeruva ühendi tekkimist. Reaktsioonisegu lahjendati veega (1 ml), ekstraheeriti EtOAc-ga (3  $\times$  2 ml), ekstrakti pesti 5%-lise NH<sub>4</sub>OH-ga (2 ml), kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga, filtreeriti ja solvent eemaldati vaakumiga. HPLC-MS analüüs näitas keerukat ainete segu, milles massispektri järgi leidis ka soovivat ühendit. Segu puhastati kolonnkromatograafia abil (eluent 4:1 heksaan/EtOAc), mis võimaldas eraldada kaks ühendit. TMR-analüüs näitas, et üks neist on 6-bromo-9-butüüldeasapuriin (13 mg) ja teine on lisandiga lähteaine, 6-bromo-7-deasapuriin (18 mg). Soovitud produkti eraldada ei õnnestunud.

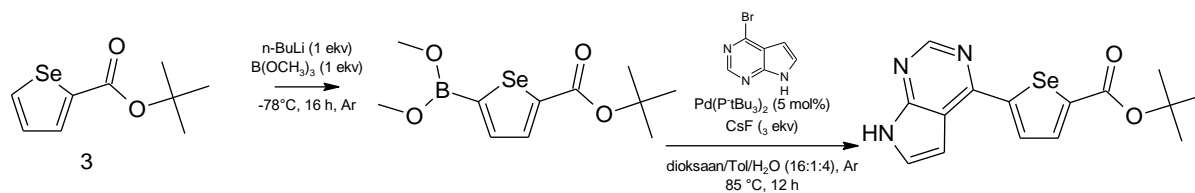
**6-bromo-9-butüüldeasapuriin:** TMR  $\delta_{1H}$  (700 MHz;  $CDCl_3$ ;  $Me_4Si$ ) 8,58 (1H; s;  $H_{ar}$ ); 7,25 (1H; d;  $J = 3,5$  Hz;  $H_{ar}$ ); 6,53 (1H; d;  $J = 3,5$  Hz;  $H_{ar}$ ); 4,27 (2H; t;  $J = 7$  Hz;  $—CH_2—CH_2$ ); 1,84 (2H; qnt;  $J = 7,7$  Hz;  $H_2C—CH_2—CH_2$ ); 1,33 (2H; qt;  $J_1 = 7,7$  Hz;  $J_2 = 7,0$  Hz;  $—CH_2—CH_3$ ); 0,95 (3H; t;  $J = 7,7$  Hz;  $—CH_3$ ). TMR  $\delta_{13C}$  (176 MHz;  $CDCl_3$ ;  $Me_4Si$ ) 150,3; 149,8; 143,9; 129,1; 120,8; 100,6; 44,9; 32,2; 19,9; 13,6 (Lisa 9).

**VIIb) Ühe kolvi 2-tert-butüüloksükarbonüülselefeni ja 9-(tert-butüüloksükarbonüül)-6-bromo-7-deasapuriini Suzuki reaktsioon:**



Ühend **3** (61 mg; 0,26 mmol; 1 ekv) lahustati eelnevalt leegis kuivatatud kolvis Ar keskkonnas kuivas THF-is (1 ml). Segu viidi temperatuurile  $-78$  °C (tahke  $CO_2$ /atsetooni vann) ja tilkhaaval lisati 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (133  $\mu$ l; 0,26 mmol; 1 ekv). Pärast 10 min segamist viidi segu temperatuurile  $-40$  °C ( $MeCN/CO_2$  vann) ja segati veel 30 min. Seejärel jahutati segu uuesti temperatuurini  $-78$  °C ja lisati tilkhaaval trimetüülboraat (30  $\mu$ l; 0,26 mmol; 1 ekv). Pärast 10 min segamist lasti segul soojeneda toatemperatuurini 30 min jooksul. Seejärel lisati ühend **6** (79 mg; 0,26 mmol; 1 ekv), CuCl (13 mg; 0,13 mmol; 0,5 ekv), Pd(OAc)<sub>2</sub>; 3,0 mg; 0,01 mmol; 0,05 ekv), dppf (7 mg; 0,01 mmol; 0,05 ekv) ja Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (173 mg; 0,65 mmol; 2 ekv) ja DMF (2 ml) [35]. Segu segati 24 h temperatuuril 60 °C Ar keskkonnas ja reaktsiooni kulgu jälgiti TLC abil (eluent 4:1 heksaan/EtOAc). Täheledatakse fluorestseeruvate ühendite tekkimist, pärast 24 h oli segus endiselt alles ühendit **3**. Reaktsioonisegu lahjendati veega (1 ml), ekstraheeriti EtOAc-ga (3 × 2 ml), ekstrakti pesti 5%-lise NH<sub>4</sub>OH-ga (2 ml), kuivatati Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga, filtreeriti ja solvent eemaldati vaakumiga. HPLC-MS analüüs näitas keerukat ainete segu, kuid massispektri järgi soovivat ühendit ei tuvastatud ja reaktsioonisegu edasi ei analüüsitud.

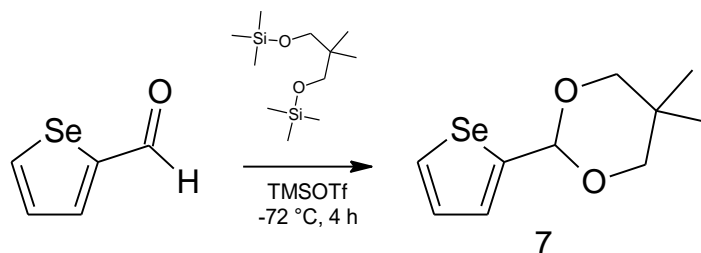
### VIIc) Ühe kolvi 2-*tert*-butüüloksükarbonüülselefeni ja 6-bromo-7-deasapuriini Suzuki reaktsioon:



Ühend **3** (50 mg; 0,22 mmol; 1 ekv) lahustati eelnevalt leegiga kuivatatud kolvis kuivas THF-is (1 ml) Ar keskkonnas. Segu viidi temperatuurile  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tahke  $\text{CO}_2$ /atsetooni vann) ja tilkhaaval lisati 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (130  $\mu\text{l}$ ; 0,26 mmol; 1,2 ekv). Pärast 30 min segamist lasti segul soojeneda toatemperatuurini ja segati veel 1 tund. Seejärel jahutati segu uuesti temperatuurini  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja lisati tilkhaaval trimetüülboraat (30  $\mu\text{l}$ ; 0,26 mmol; 1,2 ekv). Pärast 1 tundi segamist oli TLC-analüüsil (eluent 10:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) endiselt tugev lähteaine laik, mistõttu lasti reaktsioonil kesta üleöö. 16 tundi pärast reaktsiooni algust oli TLC-plaadil tugevalt fluorestseeruv laik. Reaktsioonisegule lisati 4 ml 5%-list  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lahust, saadud segu ekstraheeriti EtOAc-ga ( $3 \times 2$  ml), ekstrakti pesti küllastunud NaCl lahusega, kuivatati  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ga, filtreeriti ja solvent eemaldati vaakumiga. Saadud segu (60 mg) kasutati Suzuki reaktsiooniks täiendavalt puhastamata. Segule lisati 6-bromo-7-deasapuriin (36 mg; 0,18 mmol; 1,0 ekv), CsF (82 mg; 0,54 mmol; 3,0 ekv) ja bis(*tri-tert*-butüülfosfiin)pallaadium(0) ( $\text{Pd}(\text{t-Bu}_3\text{P})_2$ ; 5 mg; 0,01 mmol; 0,05 ekv) lahustati eelnevalt ultrahelivannis 10 min degaseeritud 1,4-dioksaani, tolueni ja  $\text{H}_2\text{O}$  segus (16:1:4; 4 ml) [36]. Kolb täideti argooniga ja viidi temperatuurile  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reaktsioonisegu segati 24 tundi ja jälgiti TLC abil (eluent  $\text{Et}_2\text{O}$ ), kuid ei täheldatud olulist lähteainete hulga vähenemist. Segu filtreeriti läbi tseliidikihi, ekstraheeriti EtOAc-ga ( $3 \times 2$  ml), EtOAc ekstrakti pesti küllastatud NaCl lahusega, kuivatati veevaba  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ga, filtreeriti ja lahusti eemaldati vaakumis. TLC-analüüsi järgi moodustasid segu peamiselt lähteained (**3** ja 6-bromodeasapuriin), seega segu edasi ei analüüsitud.

### 2.3.3. Sünteesirada III

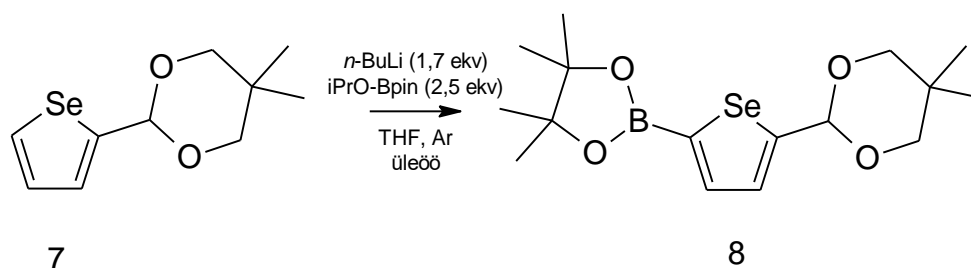
#### I) 5,5-dimetüül-2-(selenofeen-2-üül)-1,3-dioksaan (ühend 7):



Trimetüülsilüültrifluorometaan-sulfonaat (TMSOTf; 13,7  $\mu\text{l}$ ; 0,08 mmol; 0,04 ekv) lahustati 1 ml kuivatatud diklorometaanis (DCM), kolb täideti argooniga ja jahutati temperatuurini  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tahke  $\text{CO}_2/\text{EtOH}$  vann). Segule lisati 2,2-dimetüül-1,3-bis[(trimetüülsilüül)oksü]propan (563 mg; 2,26 mmol; 1,2 ekv) ja 5 min möödudes selenofeen-2-karbaldehüüd (300 mg; 1,89 mmol; 1 ekv) [37]. 4 tundi pärast reaktsiooni algust peatati reaktsioon püridiini lisamisega (38  $\mu\text{l}$ ) ja segu viidi toatemperatuurile. Reaktsioonisegu pesti 4 ml 5%  $\text{NaHCO}_3$  lahusega, saadud vesilahust ekstraheeriti DCM-iga ( $3 \times 4\text{ ml}$ ), saadud orgaanilist kihti pesti küllastunud  $\text{NaCl}$  lahusega ja kuivatati veevaba  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ga. Lahust filtreeriti, lahusti eemaldati vaakumis ja segu puhastati kolonnkromatograafia abil (heksaan/ $\text{EtOAc}$ , 3:1). TLC plaadi visualiseerimiseks kasutati ka 2,4-dinitrofenüülhüdrasiini happelist lahust, mis värvis lähteaine ja saaduse laigud roosaks (aldehüüdide/ketoonide/atsetaalide test). Produkt eraldati valge kristalse aina (332 mg; 72%).

**Ühend 7:** TMR  $\delta_{1\text{H}}$  (700 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 7,98 (1H; dd;  $J_1 = 5,6\text{ Hz}$ ;  $J_2 = 0,7\text{ Hz}$ ;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7,31 (1H; d;  $J = 4,2\text{ Hz}$ ;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 7,22 (1H; dd;  $J_1 = 5,25\text{ Hz}$ ;  $J_2 = 3,5\text{ Hz}$ ;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ); 5,60 (1H; s; —CH—); 3,75 (2H; d;  $J = 11,2\text{ Hz}$ ; — $\text{CH}_2$ —); 3,64 (2H; d;  $J = 10,5\text{ Hz}$ ; — $\text{CH}_2$ —); 1,27 (3H; s; — $\text{CH}_3$ ); 0,79 (3H; s; — $\text{CH}_3$ ). TMR  $\delta_{13\text{C}}$  (176 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 148,1; 131,0; 128,9; 127,2; 99,6; 30,2; 23,1; 21,9 (Lisa 5).

#### II) 5,5-dimetüül-2-[5-(4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan-2-üül)-selenofeen-2-üül]-1,3-dioksaan (ühend 8):

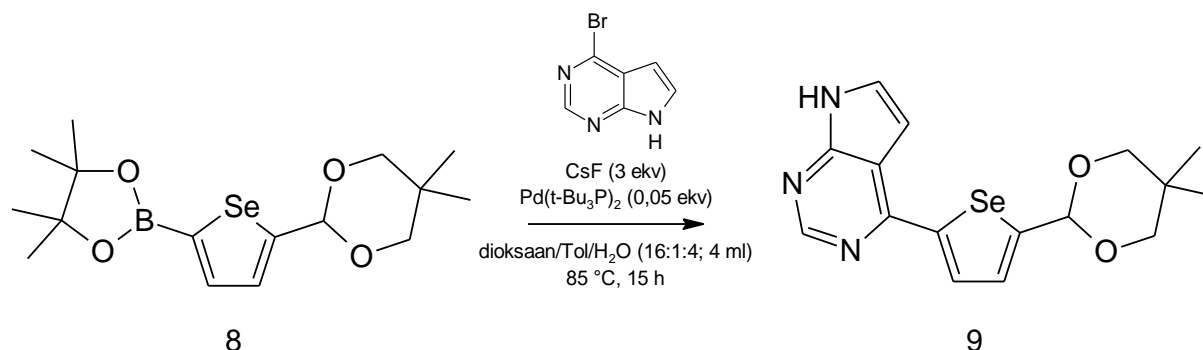


Reaktsiooni viis läbi Kaido Viht.

Ühend **7** (57 mg; 0,23 mmol; 1 ekv) lahustati Ar keskkonnas kuivas THF-is (1 ml) ning jahutati temperatuurini  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tahke  $\text{CO}_2/\text{EtOH}$  vann). Tilkhaaval lisati 2M *n*-BuLi lahus tsükloheksaanis (200  $\mu\text{l}$ ; 0,4 mmol; 1,7 ekv). Pärast 1 tundi lahuse segamist lisati tilkhaaval 2-isopropoksü-4,4,5,5-tetrametüül-1,3,2-dioksaborolaan (iPrO-Bpin; 120  $\mu\text{l}$ ; 0,58 mmol; 2,5 ekv) 2 minuti jooksul. Reaktsioonisegul lasti soojeneda toatemperatuurini ja segati üleöö. Reaktsiooni analüüsiti TLC-ga (2:1 heksaan/EtOAc). Oranžikas reaktsioonisegu kanti üle 15 ml tsentrifuugituubi, lisati 5%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  vesilahus (2 ml) ning saadud segu ekstraheeriti kaks korda dietüleetri. Saadud ekstrakti pesti küllastunud NaCl lahusega ja kuivatati  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ga. Solvent eemaldati vaakumis ning saadi 83 mg tahket ainet, mis TLC- ja TMR-analüüside järgi sisaldas lisandina reageerimata lähteainet. Saadud ainet kasutati puhastamata kujul järgmises sünteesietapis.

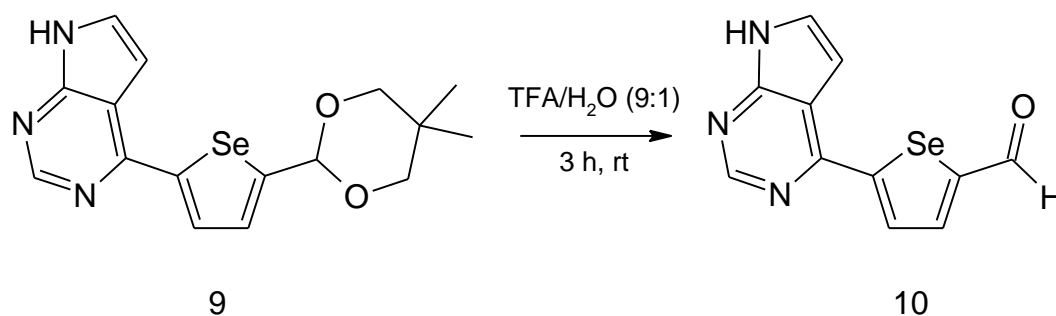
Ühend **8**: TMR  $\delta_{1\text{H}}$  (700 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 7,80 (1H; d;  $J = 3,6\text{ Hz}$ ;  $\mathbf{H}_{\text{ar}}$ ); 7,38 (1H; d;  $J = 3,6\text{ Hz}$ ;  $\mathbf{H}_{\text{ar}}$ ); 5,60 (1H; s;  $-\text{CH}(\text{OR})_2$ ); 3,77–3,60 ( $2 \times 2\text{H}$ ;  $2 \times \text{m}$ ;  $2 \times -\text{CH}_2-$ ); 1,32 (12H; s;  $-\text{CH}_3$ ); 1,25 (3H; s;  $-\text{CH}_3$ ); 0,78 (3H; s;  $-\text{CH}_3$ ) (Lisa 10).

**III) 2-[5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-üül]-5,5-dimetüül-1,3-dioksaan (ühend 9):**



Ühend **8** (80 mg; 0,22 mmol; 1,2 ekv), 6-bromo-7-deasapuriin (36 mg; 0,18 mmol; 1,0 ekv), CsF (82 mg; 0,54 mmol; 3,0 ekv) ja  $\text{Pd}(\text{t-Bu}_3\text{P})_2$  (5 mg; 0,01 mmol; 0,05 ekv) lahustati eelnevalt ultrahelivannis 10 min degaseeritud 1,4-dioksaani, tolueni ja  $\text{H}_2\text{O}$  segus (16:1:4; 4 ml). Kolb täideti argooniga ja viidi temperatuurile  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reaktsioonisegu segati 15 tundi ja jälgiti TLC abil (eluent  $\text{Et}_2\text{O}$ ). Segu filtreeriti läbi tseliidikihi, ekstraheeriti EtOAc-ga ( $3 \times 2\text{ ml}$ ), EtOAc ekstrakti pesti küllastatud NaCl lahusega, kuivatati veevaba  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ga, filtreeriti ja lahusti eemaldati vaakumis. Segu puhastati kolonnkromatograafia abil (eluent 100% MTBE) ja eraldati 30 mg ühendit **9** (saagis 46%), mida kasutati järgmises etapis täiendava puhastamiseta.

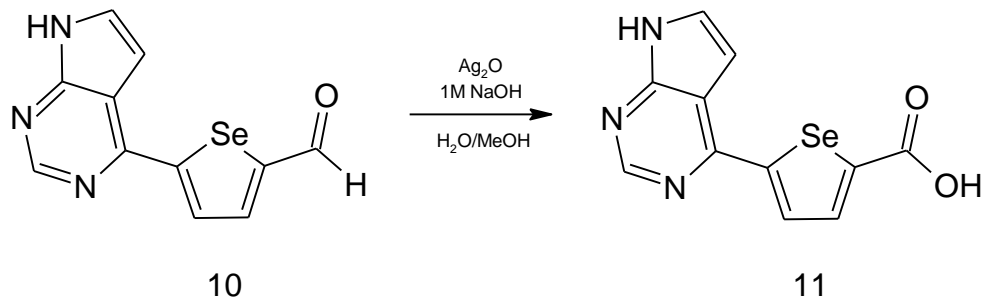
**IV) 5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karbaldehüüd (ühend 10):**



Ühendile **9** (20 mg; 0,06 mmol) lisati trifluoroetaanhappe (TFA) ja H<sub>2</sub>O segu (9:1 (v:v), 100 µl) ja segu segati 3 tundi toatemperatuuril. Segu lahjendati 4 ml Et<sub>2</sub>O-ga ja tsentrifuugiti. Tekkinud sade eraldati (13 mg) ja seda analüüsiti TMR abil, mis kinnitas aine puhtust (lissignaamid solvendijääkidest). Lisaks analüüsiti seda HPLC-ga.

**TMR**  $\delta_{1H}$  (700 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 9,88 (1H; s; —CHO); 8,77 (1H; s; **H<sub>ar</sub>**); 8,53 (1H; d; *J* = 4,2 Hz; **H<sub>ar</sub>**); 8,41 (1H; d; *J* = 4,2 Hz; **H<sub>ar</sub>**); 7,79 (1H; dd; *J*<sub>1</sub> = 2,8 Hz; *J*<sub>2</sub> = 2,8 Hz; **H<sub>ar</sub>**); 7,15 (1H; dd; *J*<sub>1</sub> = 3,5 Hz; *J*<sub>2</sub> = 1,4 Hz; **H<sub>ar</sub>**).

**IV) 5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhape (ühend 11):**



Ag<sub>2</sub>O (5 mg; suur ülehulk) lahustati ~1M NaOH lahuses (200 µl) ja segati 15 min. Ühend **11** (1 mg) lahustati 100 µl metanoolis ja lisati eelnevale segule. Segu segati toatemperatuuril 4 päeva, mille jooksul analüüsiti reaktsioonisegu HPLC abil (*t*<sub>1</sub> = 3 h; *t*<sub>2</sub> = 24 h; *t*<sub>3</sub> = 96 h). HPLC analüüsi jaoks lisati 10 µl reaktsioonisegule 100 µl 1M HCl lahust, tsentrifuugiti, tekkinud sade eraldati ja lahustati 20 µl dimetüülsulfoksiidis (DMSO). Ajahetkeks *t*<sub>3</sub> ei olnud kogu lähteaine ära reageerinud, kuid ühendi **11** hulk oli igas järgnevas ajapunktis suurem kui eelmises.

### 3. Tulemused ja arutelu

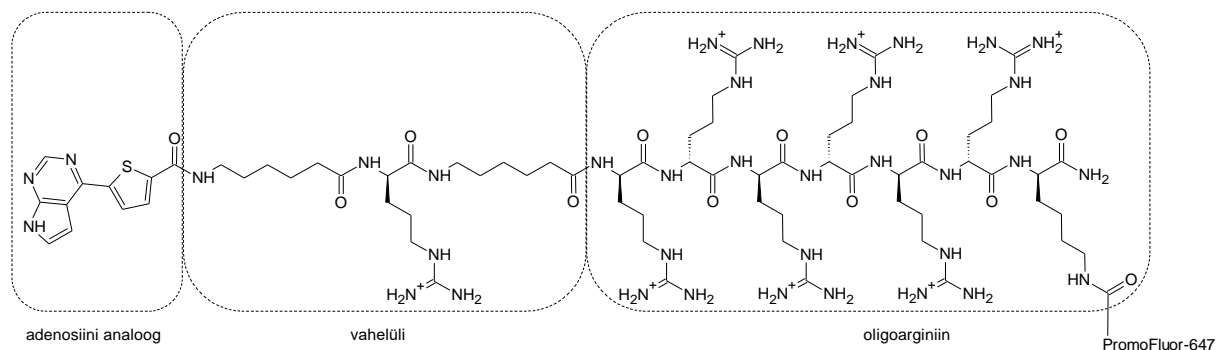
2017. aastal meditsiinilise keemia töörühmas avaldatud artiklis kirjeldatakse bisubstraatset inhibiitorit ARC-1137, mis näitas PKA suhtes üles väga kõrget afiinsust ( $K_d = 13 \text{ pM}$ ) [22]. ARC-1137 struktuur koosneb neljast osast: aromaatsed heterotsükleid – tiofeeni ja 7-deasapuriini – sisaldavast struktuuriosast, mis seondub PK ATP-taskusse, oligo-D-arginiinist, mis interakteerub PK valksubstraadi sidumispiirkonnaga, hüdrofoobsest vahelülist, mis ühendab kahte eespool nimetatud fragmenti, ning peptiidahela C-terminali külge ühendatud fluorestsensmärgisest, milleks antud struktuuris on PromoFluor-647 (**Joonis 8**). Lisaks kõrgele afiinsusele basofiilsete proteiinkinaaside suhtes on ARC-1137 PK aeglaselt kustuv fotoluminestsentssond. PK-ga mitteseondunud olekus omab ARC-1137 PromoFluor-647-le iseloomulikke fluorestsentsomadusi. Kui ARC-1137 seondub cAMP-sõltuva PK katalüütilise alaühikuga ning saadud kompleksi kiiritada UV-A kiirgusega, ergastub ATP-taskusse seondunud tiofeeni sisaldav heterotsükliline molekuliosa. PK taskus on selle struktuuriosa tripletne ergastusolek hästi stabiliseeritud ja emiteerib pika elueaga (aeglaselt kustuvat) fosforestsentskiirgust. Kuna aga molekulis on fluorestsentsmärgis, kandub energia mittekiirguslikult molekuli peptiidosa C-terminalis paiknevale fluorestsentsmärgisele ning registreeritakse pika elueaga kiirgus fluorestsensmärgisele iseloomuliku emissioonispektriga.

Erinevad väävlit ja seleeni sisaldavad heterotsükliidid on sagedasti ARC-desse kaasatud struktuurielemendid. Aromaatset väävli- või seleeniaatomiga heterotsükliid sisaldavatel ARC-del on neeldumismaksimumid ligikaudu 340–360 nm juures, mis võimaldab molekuli efektiivselt ergastada UV-A kiirgusega [16]. S- või Se-aatomit sisaldavate PKI-de pika elueaga luminestsentsi saab oluliselt võimendada fluorestsentsvärvi lisamisega. Seda põhjustab Försteri tüüpi resonantsenergia ülekanne ergastatud väävlit või seleeni sisaldavalt heterotsükliliselt süsteemilt molekuli küljes olevale fluorofoorile. Fluorestsentsvärv ergastub ja fluorestseerub.

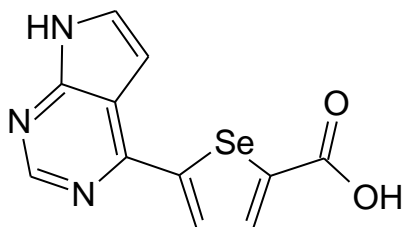
Väävli asendamisel seleeniga ei ole täheldatud ARC afiinsuse muutust, küll aga tunduvalt intensiivsemat pika elueaga luminestsentsi (30–100 korda) [16]. Se-sisaldavatel ARC-del on võrreldes S-põhistega nõrgem fluorestsents ja tugevam fosforestsents, mida põhjustab seleeni raske aatomi efekt. See nähtus suurendab tõenäosust, et toimub süsteemisisene ülekanne tripletsesse olekusse.

Bakalaureusetöö eesmärk oli sidestada selenofeen-2-karboksüülhape ja 7-deasapuriin (ühend **11**, **Joonis 9**), mida saaks kasutada ARC-1137 selenofeenanalooži sünteesimiseks.

Oletatakse, et kavandatav selenofeenipõhine ARC omab intensiivsemat luminesentsi kui ARC-1137.



Joonis 8. ARC-1137 struktuur.



Joonis 9. Töö käigus sünteesitud 5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhape, mida saab kasutada uue ARC sünteesimiseks.

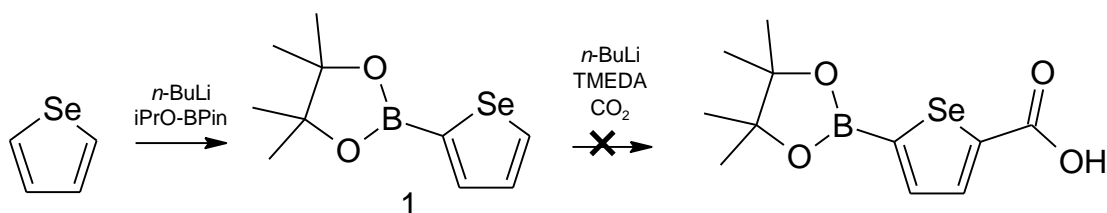
ARC-1137 adenosini mimikeeriva fragmendi sünteesimiseks kasutati tiofeeni derivaati, 5-karboksütiofeen-2-boroonhapet. See reagent oli ettevõttest Apollo Scientific soodsalt hangitav Suzuki reaktsiooni lähteaine, mistõttu oli ARC-1137 adenosini analoogi valmistamine vaid ühe etapi süntees. Kommertsiaalselt kättesaadavate selenofeeni derivaatide hulk on väga piiratud, lisaks on nende valmistamist ja võimalikke sünteesiradu tunduvalt vähem kirjanduses avaldatud.

VIA rühma elementidena on väävli ja seleeni keemilised omadused valdavalt sarnased. Seleeni aatommass ja -raadius on suuremad ja kovalentsed sidemed süsiniku ja vesinikuga nõrgemad kui väävli. Need omadused muudavad selenorgaanilised ühendid väävelorgaanilistega võrreldes reaktiivsemaks ja mõnevõrra ebastabiilsemaks [38].

Selenofeen-2-karboksüülhappe ja 7-deasapuriini sidestamiseks otsustati samuti kasutada Suzuki reaktsiooni. Iga planeeritud sünteesiraja saab jagada kolmeks: a) Suzuki reaktsiooniks sobivate lähteainete süntees (derivatiseerimine, kaitserühmade lisamine), b) Suzuki reaktsioon ja c) funktsionaalrühmade teisendamine.

### 3.1. Sünteesirada I

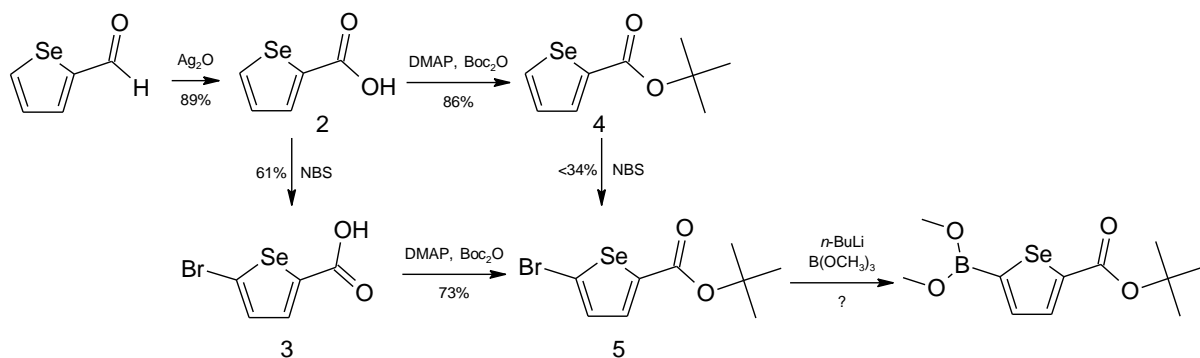
Algselt planeeritud sünteesirada hõlmas selenofeeni 2. asendisse boroonhappe pinakoolestri ja seejärel 5. asendisse karboksüülrühma lisamist, et saada Suzuki reaktsiooni lähteaine, mis ei vajaks pärast sidestamist edasist töötlust. Kuigi selenofeeni derivatiseerimine boroonhappe pinakoolestriks toimus kõrge saagisega (96%), ei olnud edasistel katsetatud meetoditel võimalik saadud ühendile karboksüülrühma lisada (**Joonis 10**). Karboksüülrühma lisamiseks kasutati tahket süsihappegaasi ja reaktsioonisegu tilgutati CO<sub>2</sub> tükkidele. Reaktsiooni viidi võrdlemise eesmärgil läbi nii autori poolt sünteesitud kui ka kommertsiaalselt kättesaadava ainega. Kummalgi juhul ei esinenud TMR spektris karboksüülrühma signaali. Kõige tõenäolisemalt oli põhjuseks produkti ebastabiilsus.



**Joonis 10.** Sünteesirada I: läbi viidud reaktsioonid ja tulemused.

### 3.2. Sünteesirada II

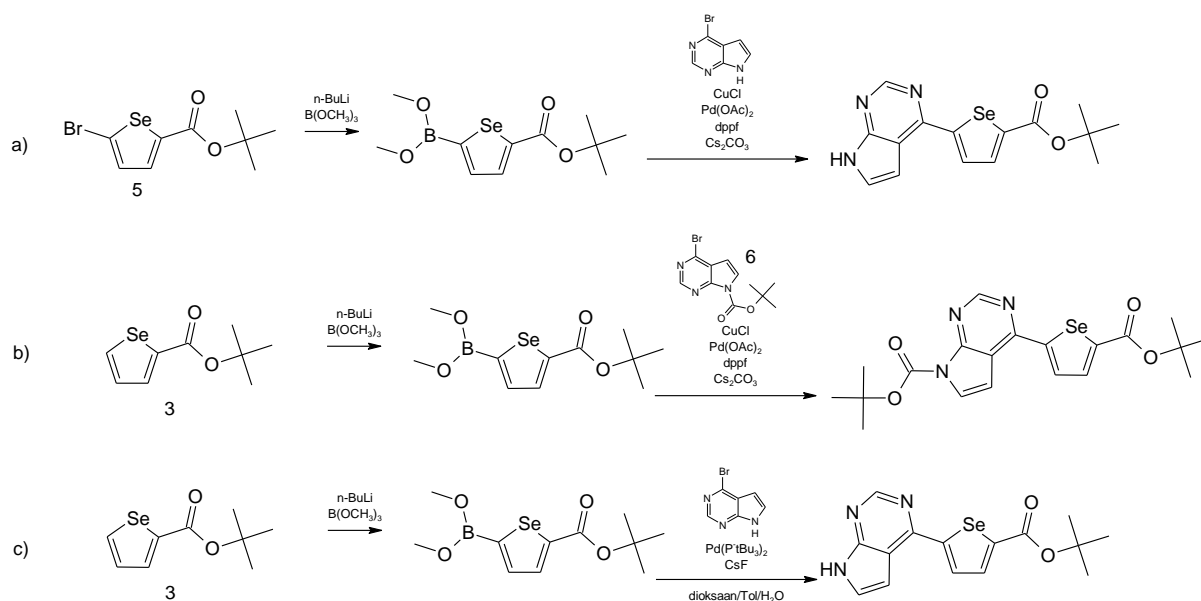
Järgmisena otsustati katsetada sünteesirada, mis hõlmab selenofeen-2-karbaldehüüdi oksüdeerimist vastavaks karboksüülhappeks, saadud 2-karboksüülselenofeenile 5. asendisse boroonhappe estri lisamist ja Suzuki reaktsiooni. Eeskujuks võeti kirjandusest leitud patendikirjeldusest analoogne sünteesirada, kus tiofeen-2-karboksüülhappele lisati 5. asendisse broomiaatom ja seejärel asendati see boroonhappe estriga (saagis 56%) [33]. Enne boroonhappe estri lisamist derivatiseeriti patendikirjelduse järgi karboksüülrühm *tert*-butüülestriks (**Joonis 11**).



**Joonis 11.** Sünteesirada II: läbi viidud reaktsioonid Suzuki reaktsiooni lähteainete valmistamiseks ja tulemused.

Selenofeen-2-karbaldehüüdi oksüdeerimine 2-karbonsüülhappeks (ühend **2**) hõbe(I)oksiidiga aluselises keskkonnas kulges kõrge saagisega (89%) ning saadus ei vajanud kromatograafilist puhastamist. Seejärel kontrolliti, kas optimaalsem on kõigepealt ühendit **2** broomida (ühend **3**) või derivatiseerida see *tert*-butüülestriks (ühend **4**). Kuigi ühendi **2** esterdamine kulges kõrge saagisega (86%), toimus ühendi **4** broomimine saagisega 34% ja produktis olid lisandid ka pärast kolonnkromatograafilist puhastamist (summaarne saagis üle kahe etapi 29%). Seega osutus efektiivsemaks sünteesijärjekord **2**→**3**→**5**, saagistega vastavalt 61% ja 73% (summaarne saagis vastavalt 45%).

Boroonhappe estrid (nt metüül- või pinakoolestrid) on õhu- ja niiskuskindlad ja sageli ka kromatograafiliselt puhastatavad, seega on nad vastavatest boroonhapetest mugavamad reagentid. Just seetõttu derivatiseeritakse Suzuki reaktsioonis sidestatav alküül- või arüülrühm boroonhappe estriks. Kuigi ühendi **5** boroonhappe estriks derivatiseerimisel tekkis TLC analüüsi põhjal lisaks lähteainele uus ühend, oli pärast kolonnkromatograafilist puhastamist võimalik eraldada vaid lähteaine. Seetõttu otsustati järgmise katsena sünteesida vastav boroonhappe ester ja samas reaktsiooninõus viia kohe läbi Suzuki reaktsioon (**Joonis 12a**) vastavalt kirjandusest leitud eeskirjale [35].



**Joonis 12.** Sünteesirada II: Suzuki reaktsioonid erinevate lähteainekombinatsioonidega.

Suzuki reaktsiooni TLC analüüsil täheldati tugevalt fluorestseeruvat laiku, mis on omane soovitatavale produktile. Kolonnkromatograafia abil oli võimalik eraldada vaid kaks ainet, mis olid vastavalt ebapuhas lähteaine, 6-bromo-7-deasapuriin, ja 6-bromo-9-butüül-7-deasapuriin. Suur hulk Suzuki reaktsiooni üht lähteainet ja selle kõrvalprodukti annab alust oletada, et esimeses etapis ei kulgenud liitium-halogeenvahetus ja sellele järgnev boroonestri lisamine

hästi. Tõenäoline mehhanism butüül-asendatud deasapuriini tekkimiseks on deasapuriini deprotoneerumine aluselises keskkonnas ja reageerimine liitium-halogeenvahetuse etapis kõrvalproduktina tekkinud butüülbromiidiga.

Selliste kõrvalproduktide vältimiseks otsustati korduskatses kasutada bromeerimata selenofeeni *tert*-butüülestrit. Lisaks kaitsti 6-bromo-7-deasapuriini happeline vesinik Boc-rühmaga, et vältida selle deprotoneerumist. Muid reaktsiooniparameetreid ei muudetud (**Joonis 12b**). Jällegi täheldati reaktsiooni jooksul tekkivaid fluorestseeruvaid laike TLC plaadil, kuid toorsegu HPLC-MS analüüsil ei olnud võimalik tuvastada soovitavaile produktile iseloomulikke signaale (neeldumismaksimum vahemikus 340–360 nm ja molekulmass 448 Da, Lisa 12).

Järgmisena optimeeriti kirjandusest leitud eeskirja [36] põhjal Suzuki reaktsiooni reagente ja solventi (**Joonis 12c**). Kahtlustati, et esimeses etapis ei pruugi kogu *n*-BuLi ära reageerida, mistõttu hapestati, ekstraheeriti ja kuivatati esimese etapi reaktsioonisegu. Juba esimeses etapis täheldati TLC plaadil tugevalt fluorestseeruvat laiku, küll aga ei tekkinud edasises Suzuki reaktsioonis lisaks lähteainetele uut laiku. Ka HPLC-MS analüüs ei näidanud soovitud produktile omaseid signaale (Lisa 13).

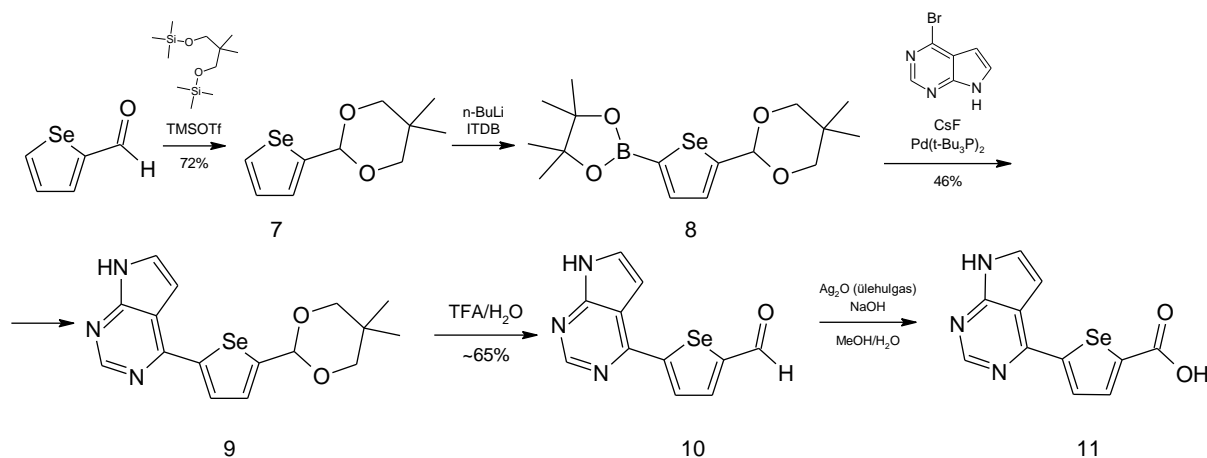
Kuigi boroonhappe estrid on sagedasti kasutatavad Suzuki reaktsiooni reagentid, ei ole need enamasti piisavalt reaktiivsed katalüütilisse tsüklisse sisenemiseks. Seega tuleks kohandada katsetingimusi nii, et ester hüdrolüüsuks vastavaks boroonhappeks, st lisada vett [35]. Lisaks kaitserühma ebasobivusele võis ka see reaktsioonides a) ja b) rolli mängida, sest kui boroonhappe estri derivaati ka vähesel määral tekkis, viidi reaktsioon läbi veevabas keskkonnas.

Karboksüülhappe kaitsmisel Boc-rühmaga säilib molekulis elektrofiilne tsepter, mis tõenäoliselt ei olnud piisavalt vastupidav nukleofiilsele *n*-BuLi-le. Seetõttu otsustati sünteesirada muuta viisil, mis kulgeks üle stabiilsemaid funktsionaalrühmi sisaldavate ühendite.

### 3.3. Sünteesirada III

Kolmandas katsetatud sünteesirajas lähtuti samuti selenofeen-2-karbaldehüüdist, kuid seda oksüdeeritud karboksüülhappeks, vaid kaitsti atsetaali moodustamisega. Tsükliline atsetaal on vastupidav kaitserühm nukleofiilidele, sh aluselises keskkonnas. Aldehüüdrühma

derivatiseerimine tsükliliseks atsetaaliks (ühend **7**) võimaldas boroonhappe estri lisamise ja sellele järgneva Suzuki reaktsiooni (**Joonis 13**).



**Joonis 13.** Sünteesirada III: läbi viidud reaktsioonid ja tulemused.

Erinevalt sünteesiradadest I ja II suudeti sünteesida ja eraldada ühend **8** (boroonhappe estri derivaat). Reaktsiooni kordamisel saadud ühend sisaldas pärast silikageelil kromatograafilist puhastamist siiski ka lähteainet ning oli märgata aine lagunemist silikageelil (Lisa 10). Täiendavalt puhastamata ühendiga **8** läbi viidud Suzuki reaktsiooni kulgu TLC abil jälgides täheldati tugevalt fluorestseeruva laigu tekkimist ja vähesel määral lähteaineid, mida kinnitas ka reaktsioonisegu HPLC-MS analüüs (Lisa 14). HPLC kromatogrammil tuvastati ühend **9** retentsioonijaga 12,2 min, mille massispekter oli seleeni sisaldavatele ühenditele omase isotoopjaotusega ja näitas õige  $M/z$  väärtusegaiooni olemasolu (molekulmass 362 Da). Saaduse neeldumismaksimum oli lainepikkusel 352 nm. Ühend **9** oli kolonnkromatograafiliselt hõlpsasti puhastatav. Järgnevalt eemaldati ühendi **9** atsetaal-kaitserühm TFA/ $H_2O$  seguga. Reaktsioonisegu analüüsil oli näha, et reaktsioon kulges lõpuni ja kõrvalsaadusteta (Lisa 15). Ühend **10** tuvastati retentsioonijaga 10,6 min, seleeni isotoopjaotuse põhjal molekulmassile 276 Da vastavas piirkonnas massispektris ja neeldumismaksimumiga 366 nm. Viimaseks etapiks, **10**→**11**, korrati sünteesirajas II kasutatud hõbe(I)oksiidiga oksüdeerimise meetodit. Nii ühendit **10** kui **11** iseloomustab kehv lahustuvus vees, seetõttu viidi reaktsioon läbi NaOH vesilahuse ja metanooli segus. Paraku oli ka selles keskkonnas nii reaktsiooni lähteaine kui ka saaduse lahustuvus kehv, mis tõenäoliselt selgitab reaktsiooni kiiruse märkimisväärset vähenemist. Oksüdeerimisreaktsiooni jälgiti HPLC analüüsi abil kokku 4 päeva, mille jooksul lähteaine piik vähenes ja soovitava produkti piik kasvas, kuid siiski ei reageerinud lähteaine sel ajavahemikul ära täiel määral (Lisa 16). Ühend **11** tuvastati retentsioonijaga 8,9 min, molekulmassiga 292 Da ja neeldumismaksimumiga 358 nm. Sellegipoolest tõestati, et kasutatud sünteesirajaga III on võimalik selenofeen-2-aldehüüdist lähtudes sünteesida 5-(7H-

pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhape, mis on edasiseks ARC-tüüpi inhibiitori sünteesiks sobilik lähteaine.

### **3.4. Lõpphinnang ja töö edasiarendused**

Töö käigus saavutati seatud eesmärk, milleks oli leida potentsiaalne sünteesirada 5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhappe valmistamiseks. Produktiivseks osutus sünteesirada III, mis vajab kordamist ja täiendavat optimeerimist, et oleks võimalik määrata ka lõppühendi saagis. Sünteesiraja viimases etapis osutus piiravaks asjaoluks nii lähteaine kui saaduste kehv lahustuvus, mida oleks võimalik suurendada näiteks lahustuvust parandava kaitserühmaga deasapuriini N9 küljes.

Töö edasiarendusena kasutatakse sünteesitud lõppühendit uue ARC-tüüpi inhibiitori sünteesimiseks tahkefaasisünteesi meetodil. Lisaks saaks mõõta lõppühendi luminesentsomadusi ja võrrelda neid ühendiga ARC-1137.

## Kokkuvõte

Töö eesmärk oli sünteesida selenofeeni tuuma ja 7-deasapuriini sisaldav ühend, mida saaks edaspidi kasutada proteiinkinaaside pika elueaga luminestsentsiga inhibiitori sünteesimiseks. Selenofeeni derivaatide omadusi ja reaktsioone on võrdlemisi vähe uuritud, kuid neid sisaldavad PK inhibiitorid on huvipakkuvad PK fotoluminestsentssondide arenduses.

Töö käigus katsetati kolme sünteesirada selenofeenist või selenofeen-2-karbaldehüüdist 5-(7H-pürrolo[2,3-d]pürimidiin-4-üül)selenofeen-2-karboksüülhappe saamiseks. Soovitava tulemuse andis sünteesirada, mis kulges üle selenofeen-2-karbaldehüüdi tsükliiliseks atsetaaliks, sest antud ühend on piisavalt stabiilne sünteesiraja kriitilistes etappides – boroonhappe estri valmistamisel ja selle järgneva Suzuki sidestusreaktsiooni tingimustes. Tehti järeldusi selenofeeni derivaatide reaktiivsuse, stabiilsuse ja kaitserühma olulisuse kohta. Katsetati selenofeen-boroonhappe estrite ja 6-bromo-7-deasapuriini vahelist Suzuki sidestusreaktsiooni erinevate reaktsioonitingimustega.

## Summary

### **Synthesis of a compound containing selenophene and deazapurine for the development of photoluminescent probes of protein kinases**

Eva Lea Jääger

The aim of the thesis was to synthesize a compound containing 7-deazapurine and selenophene-2-carboxylic acid that could be used for the synthesis of a protein kinase probe that exhibits long lifetime luminescence upon irradiation. The properties and reactivity of selenophene derivatives have not been studied extensively, however intense luminescence has been observed in inhibitors that include selenophene derivatives in their structure. This phenomenon can be implemented in luminometric assays of the inhibitor.

The theoretical part of the thesis gives an overview of the properties and catalytic mechanism of protein kinases, their inhibitors and ARC (adenosine-oligoarginine conjugate) type inhibitors developed in the Medicinal Chemistry research group of the University of Tartu, as well as a brief overview of various photophysical processes.

In the experimental part of the thesis, three different synthesis routes for obtaining the conjugate of 7-deazapurine and selenophene-2-carboxylic acid were tested. A positive result was achieved by derivatizing 2-formylselenophene to the corresponding cyclic acetal. This provided a protecting group that is stable enough in the following stages of boronic ester formation and Suzuki coupling. Observations and conclusions of the reactivity, stability and the importance of the selection of the protecting group of the selenophene derivatives were made. The Suzuki coupling of selenophene-boronic esters and 6-bromo-7-deazapurine was tested with various reaction conditions.

## Kasutatud kirjandus

- [1] Hunter, T. Why Nature Chose Phosphate to Modify Proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2012**, *367* (1602), 2513–2516.
- [2] Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2271–2290.
- [3] Turnham R. E.; Scott J. D. Protein Kinase A Catalytic Subunit Isoform PRKACA; History, Function and Physiology. *Gene* **2016**, *577* (2), 101–108.
- [4] Zheng, J. Kristallstruktuur (PDB ID 1ATP) RSCB Protein Data Bank veebilehelt, töödeldud programmiga Pymol. Viimati alla laetud 24.05.2021 veebilehelt <https://www.rcsb.org/structure/1ATP>.
- [5] Hardie, G. *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*, 2nd ed.; The Practical Approach Series; Oxford University Press: New York, USA, **1999**, pp. 221–224.
- [6] Carnegie, G. K.; Means, C. K.; Scott, J. D. A-Kinase Anchoring Proteins: From Protein Complexes to Physiology and Disease. *IUBMB Life* **2009**, *61* (4), 394–406.
- [7] Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2021 Update. *Pharmacol. Res.* **2021**, *165*, 105463.
- [8] Roskoski, R. Classification of Small Molecule Protein Kinase Inhibitors Based upon the Structures of Their Drug-Enzyme Complexes. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 26–48.
- [9] Blue Ridge Institute for Medical Research (List of FDA-Approved Targeted Small Molecule Protein Kinase Inhibitors); <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm> viimati uuendatud 30.03.2021.
- [10] Lamba, V.; Ghosh, I. New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (20), 2936–2945.
- [11] Murray, J. M.; Bussiere, D. E. Targeting the Purinome. *Chemogenomics; Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Humana Press: Totowa, NJ, **2009**; Vol. 575, pp 47–92.
- [12] Lavõgina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: From Principle to Practical Applications. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 23–34.
- [13] Lee, S.; Kim, J.; Jo, J.; Chang, J. W.; Sim, J.; Yun, H. Recent Advances in Development of Hetero-Bivalent Kinase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *216*, 113318.
- [14] Loog, M.; Uri, A.; Raidaru, G.; Järv, J.; Ek, P. Adenosine-5'-Carboxylic Acid Peptidyl Derivatives as Inhibitors of Protein Kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (10), 1447–1452.
- [15] Enkvist, E.; Viht, K.; Bischoff, N.; Vahter, J.; Saaver, S.; Raidaru, G.; Issinger, O.-G.; Niefind, K.; Uri, A. A Subnanomolar Fluorescent Probe for Protein Kinase CK2 Interaction Studies. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (43), 8645–8653.
- [16] Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (10), 1052–1062.
- [17] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: USA, 2007, pp. 3–15.

- [18] Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds*; Wiley: Chichester, United Kingdom, **2009**, pp. 25–29.
- [19] *Fluorescence and Phosphorescence*; <https://chem.libretexts.org/@go/page/41400> viimati uuendatud 01.09.2020.
- [20] A Photoluminescent Molecular Complex and Method for Determining of the Concentration of Said Molecular Complex. Enkvist, E.; Kasari, M.; Uri, A.; Vaasa, A. Pat. No. WO2012101236A1, **2012**.
- [21] 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.
- [22] Ivan, T.; Enkvist, E.; Sinijärv, H.; Uri, A. Competitive Ligands Facilitate Dissociation of the Complex of Bifunctional Inhibitor and Protein Kinase. *Biophys. Chem.* **2017**, *228*, 17–24.
- [23] Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective Synthesis of Arylated (E)-Alkenes by the Reaction of Alk-1-Enylboranes with Aryl Halides in the Presence of Palladium Catalyst. *J Chem Soc Chem Commun* **1979**, (19), 866–867.
- [24] Lennox, A. J. J.; Lloyd-Jones, G. C. Selection of Boron Reagents for Suzuki–Miyaura Coupling. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (1), 412–443.
- [25] Lima, C. F. R. A. C.; Rodrigues, A. S. M. C.; Silva, V. L. M.; Silva, A. M. S.; Santos, L. M. N. B. F. Role of the Base and Control of Selectivity in the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction. *ChemCatChem* **2014**, *6* (5), 1291–1302.
- [26] Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (7), 2457–2483.
- [27] Suzuki, A. Cross-Coupling Reactions via Organoboranes. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653* (1), 83–90.
- [28] Haid, S.; Mishra, A.; Uhrich, C.; Pfeiffer, M.; Bäuerle, P. Dicyanovinylene-Substituted Selenophene–Thiophene Co-Oligomers for Small-Molecule Organic Solar Cells. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (20), 4435–4444.
- [29] Novel Hydrophilic Derivatives of 2-Aryl-4-Quinolones as Anticancer Agents. Kuo, S-C. Pat. No. US20130244983. **2008**.
- [30] Kore, A. R.; Yang, B.; Thiagarajan, S. S.; Srinivasan, B. Synthesis and Substrate Evaluation of (E)-5-[(3-Selenophene-2-Carboxamido)Prop-1-En-1-Yl]-Uridine-5'-O-Triphosphate for RNA Polymerase. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2015**, *34* (12), 866–876.
- [31] Palamà, I.; Di Maria, F.; Viola, I.; Fabiano, E.; Gigli, G.; Bettini, C.; Barbarella, G. Live-Cell-Permeant Thiophene Fluorophores and Cell-Mediated Formation of Fluorescent Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (44), 17777–17785.
- [32] Hayashi, H.; Sobczuk, A.; Bolag, A.; Sakai, N.; Matile, S. Antiparallel Three-Component Gradients in Double-Channel Surface Architectures. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (12), 4610–4614.
- [33] Preparation of Pyrimidyl-Thiophene Derivatives as Aurora Kinase Inhibitors. Adams, J. L.; Drewry, D. H.; Linn, J. A. Pat. No. WO2001098290A2, **2007**.
- [34] Processes for Preparing JAK Inhibitors and Related Intermediate Compounds. Jiacheng, Z. US2013253190 (A1), **2010**.

- [35] Hergert, T.; Varga, B.; Thurner, A.; Faigl, F.; Mátravölgyi, B. Copper-Facilitated Suzuki-Miyaura Coupling for the Preparation of 1,3-Dioxolane-Protected 5-Arylthiophene-2-Carboxaldehydes. *Tetrahedron* **2018**, *74* (16), 2002–2008.
- [36] Huang, Q.; Richardson, P. F.; Sach, N. W.; Zhu, J.; Liu, K. K.-C.; Smith, G. L.; Bowles, D. M. Development of Scalable Syntheses of Selective PI3K Inhibitors. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15* (3), 556–564.
- [37] Hwu, J. R.; Leu, L. C.; Robl, J. A.; Anderson, D. A.; Wetzel, J. M. General Scope of 1,3-Dioxolanation of Alpha-Beta-Unsaturated Aldehydes with 1,2-Bis(Trimethylsilyloxy)Ethane and Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (2), 188–191.
- [38] Iwaoka, M.; Arai, K. From Sulfur to Selenium. A New Research Arena in Chemical Biology and Biological Chemistry. *Curr. Chem. Biol.* **2013**, *7* (1), 2–24.

## **Lisad**

**Lisa 1.** Ühendi 2 TMR spektrid.

**Lisa 2.** Ühendi 3 TMR spektrid.

**Lisa 3.** Ühendi 4 TMR spektrid.

**Lisa 4.** Ühendi 5 TMR spektrid.

**Lisa 5.** Ühendi 7 TMR spektrid.

**Lisa 6.** Ühendi 1 TMR spektrid.

**Lisa 7.** Ühendi 6 TMR spektrid.

**Lisa 8.** Ühendi 10 TMR spekter.

**Lisa 9.** 6-bromo-9-butüüldeasapuriini spekter.

**Lisa 10.** Ühendi 8 TMR spekter.

**Lisa 11.** Sünteesirada II; VIIa reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

**Lisa 12.** Sünteesirada II; VIIb reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

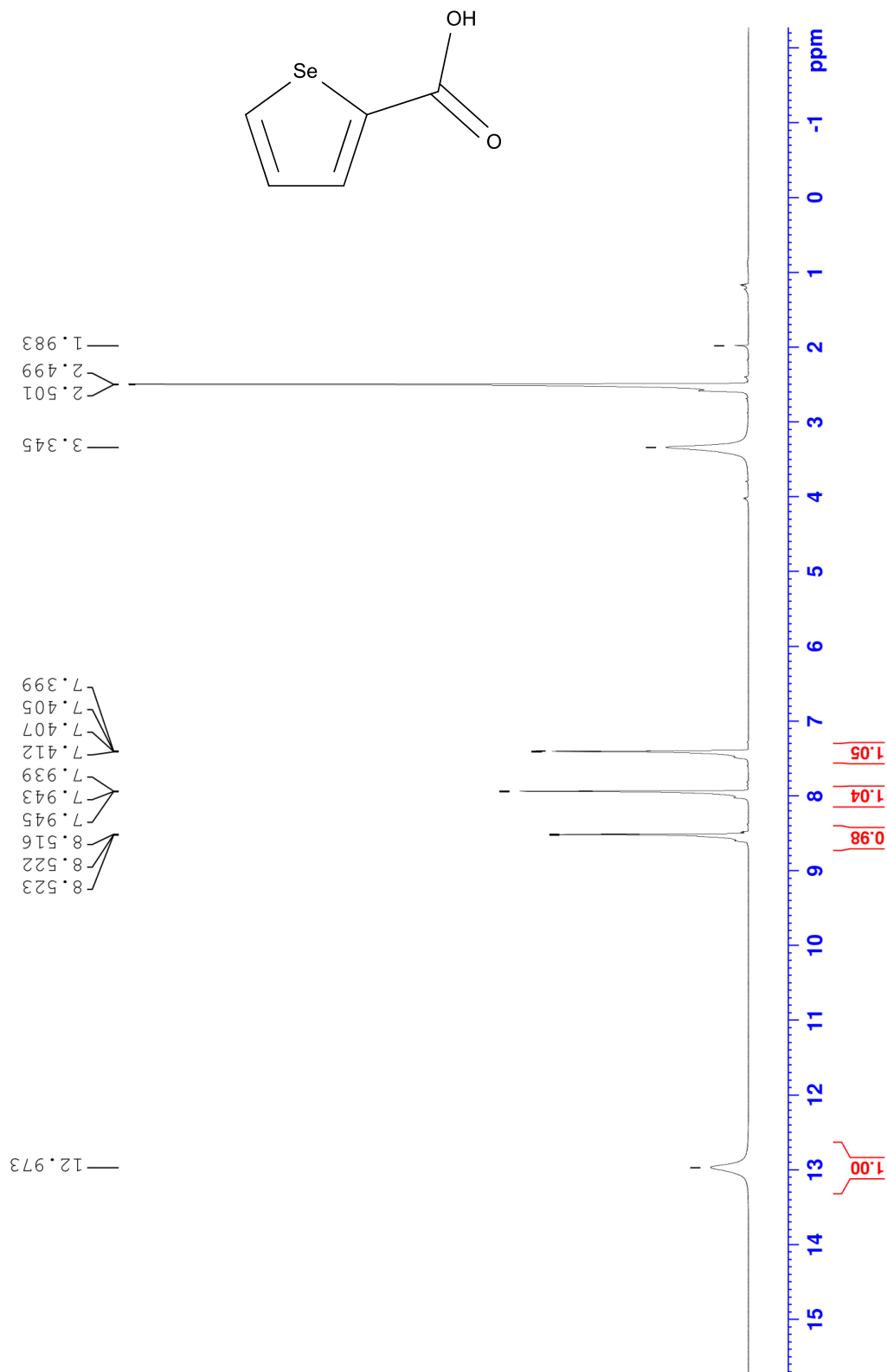
**Lisa 13.** Sünteesirada II; VIIc reaktsioon. HPLC-MS analüüs (kahel lehel).

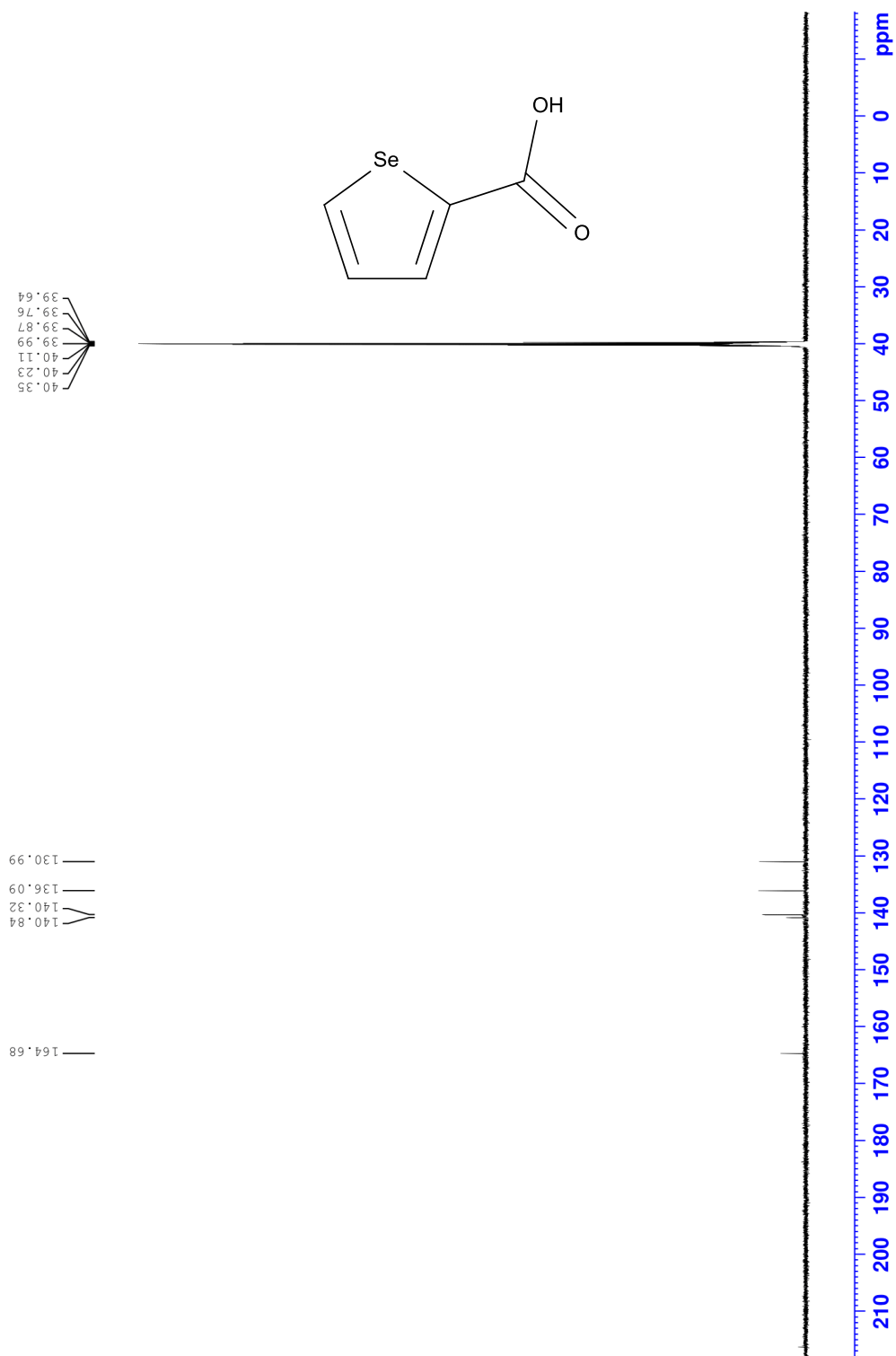
**Lisa 14.** Sünteesirada III; III reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs (kahel lehel).

**Lisa 15.** Sünteesirada III; IV reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

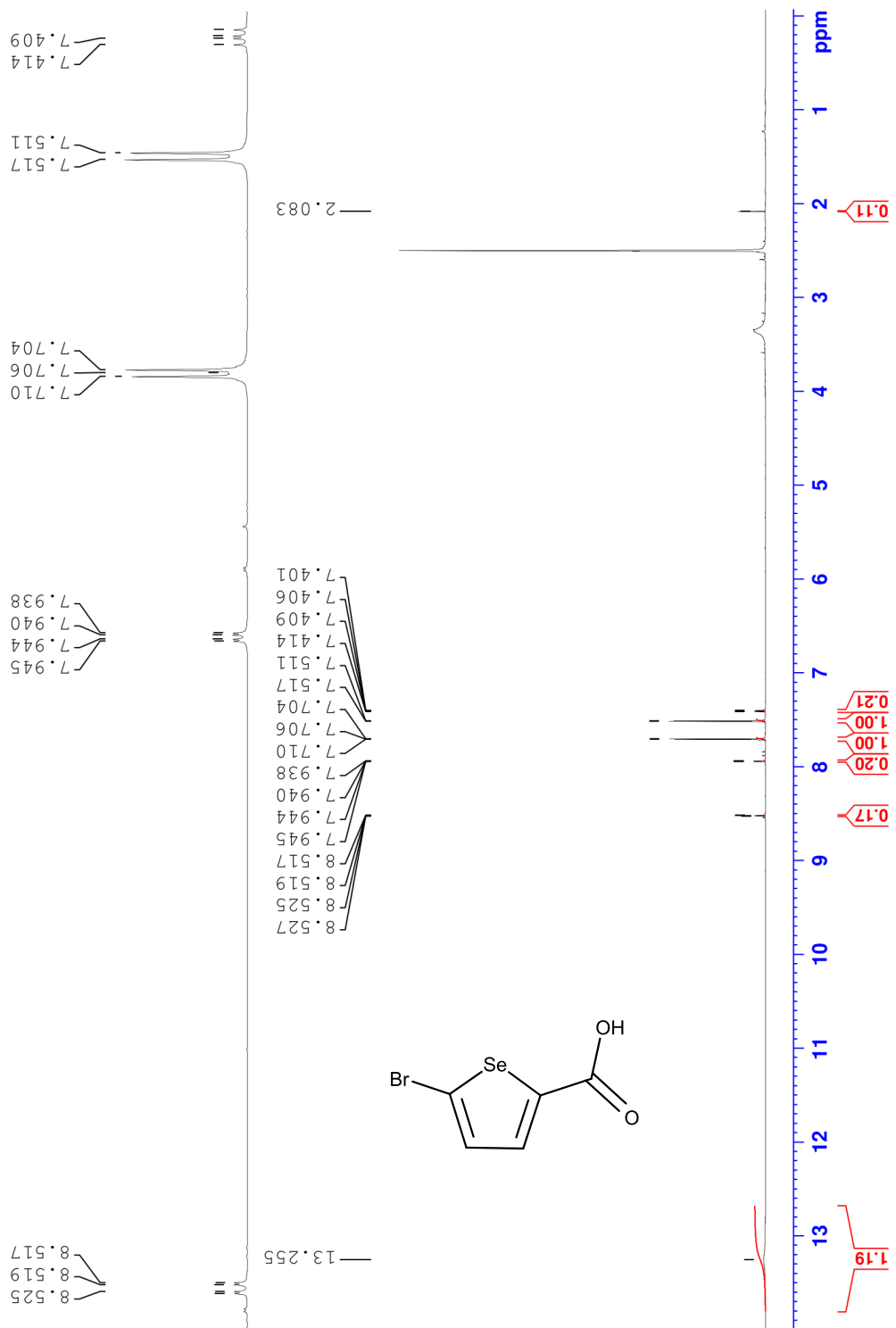
**Lisa 16.** Sünteesirada III; V reaktsioon. Reaktsioonisegu ajahetkedel  $t_1 = 3$  h,  $t_2 = 24$  h,  $t_3 = 96$  h (kolmel eri lehel).

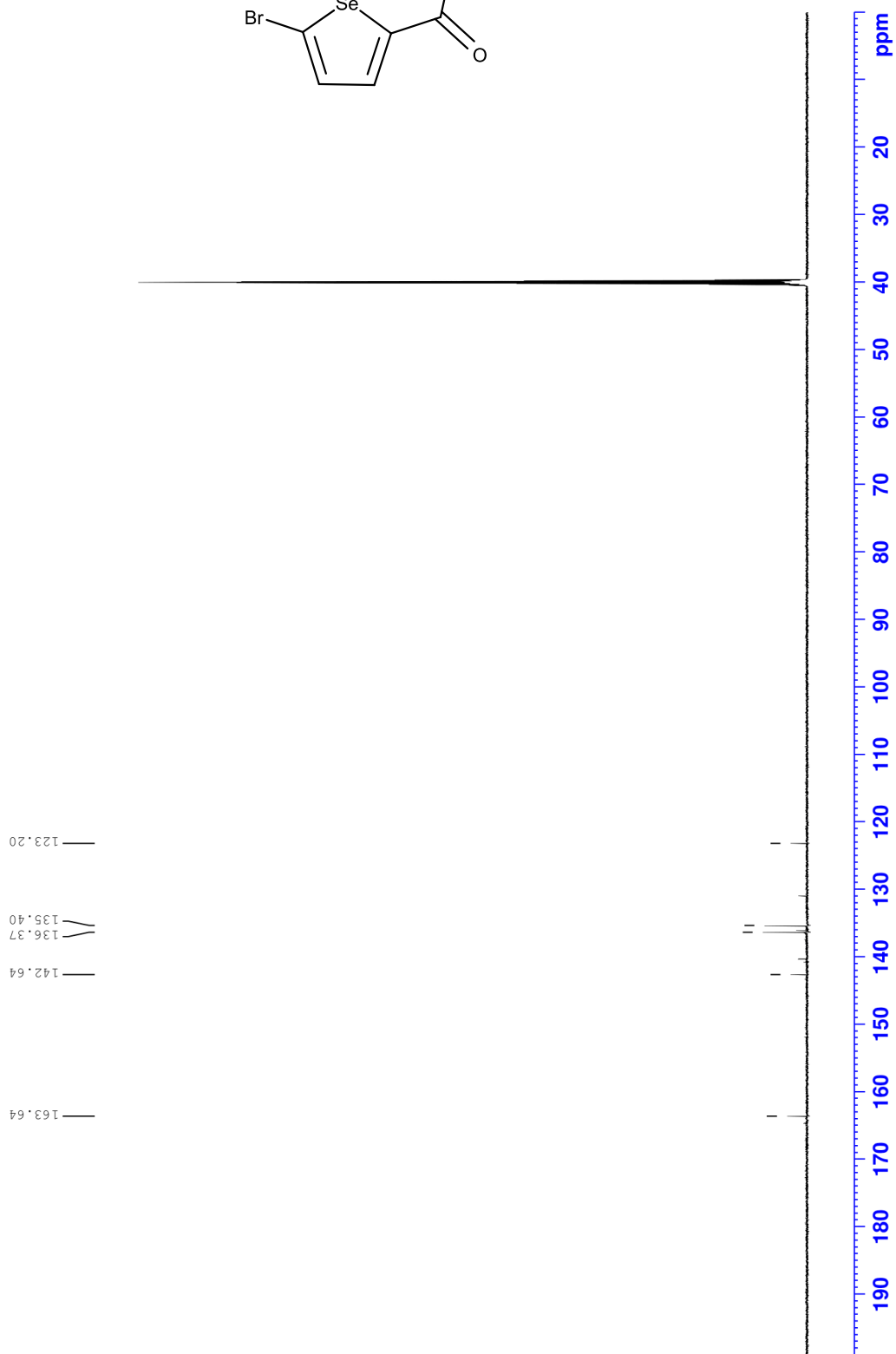
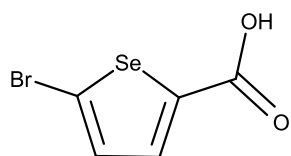
Lisa 1. Ühendi 2  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



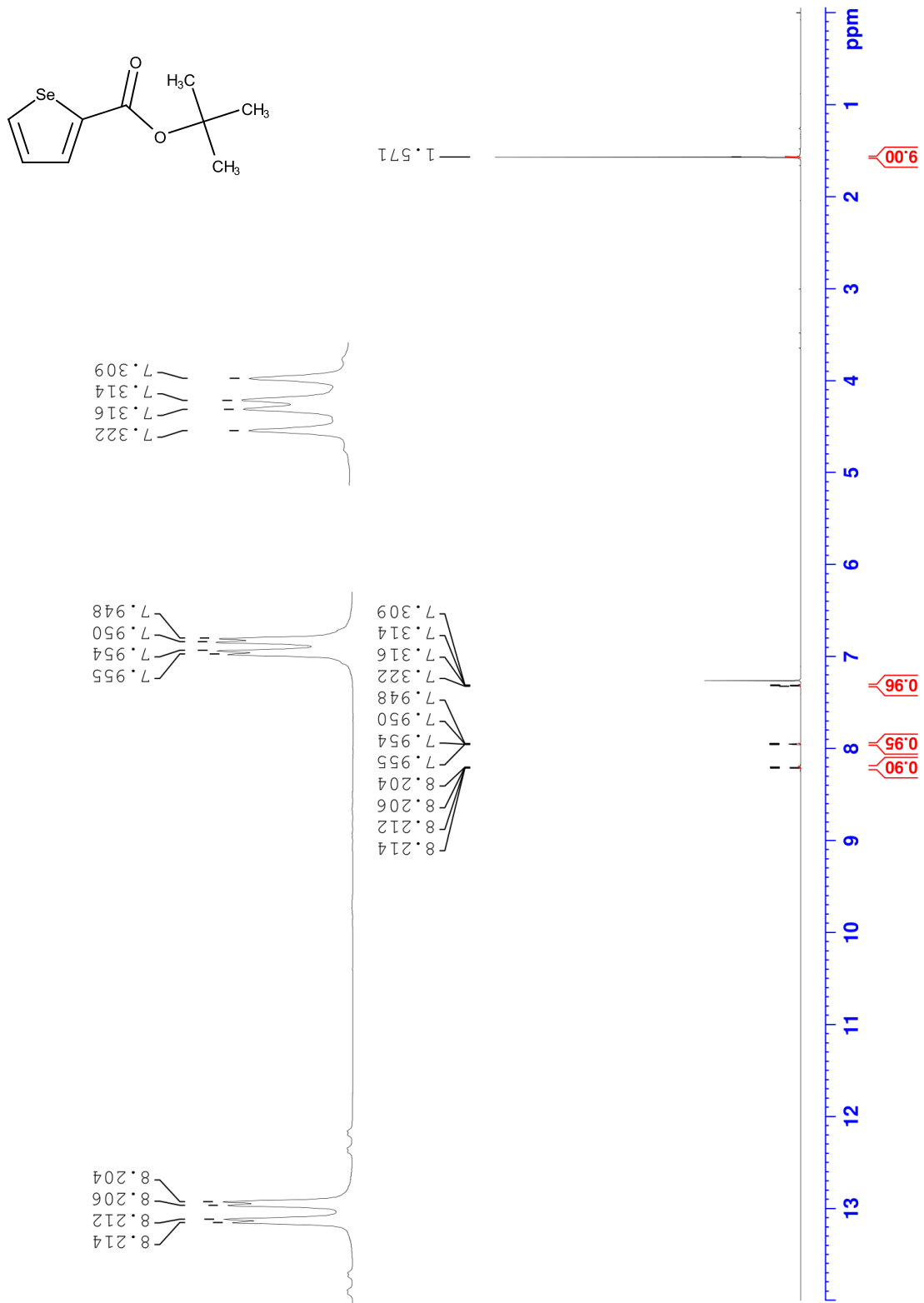


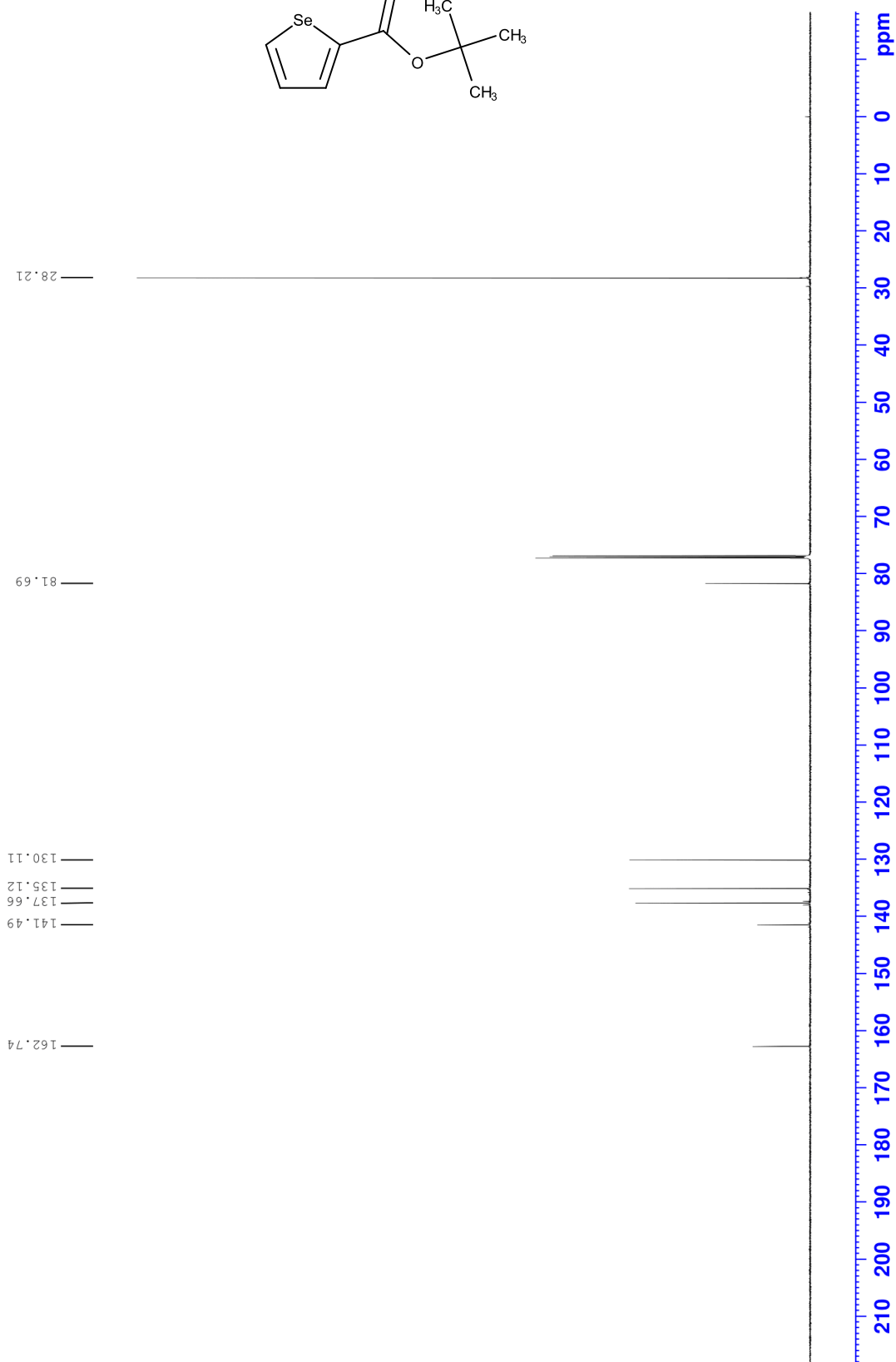
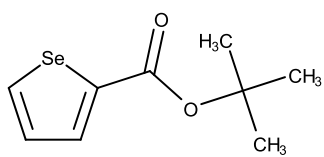
Lisa 2. Ühendi 3  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



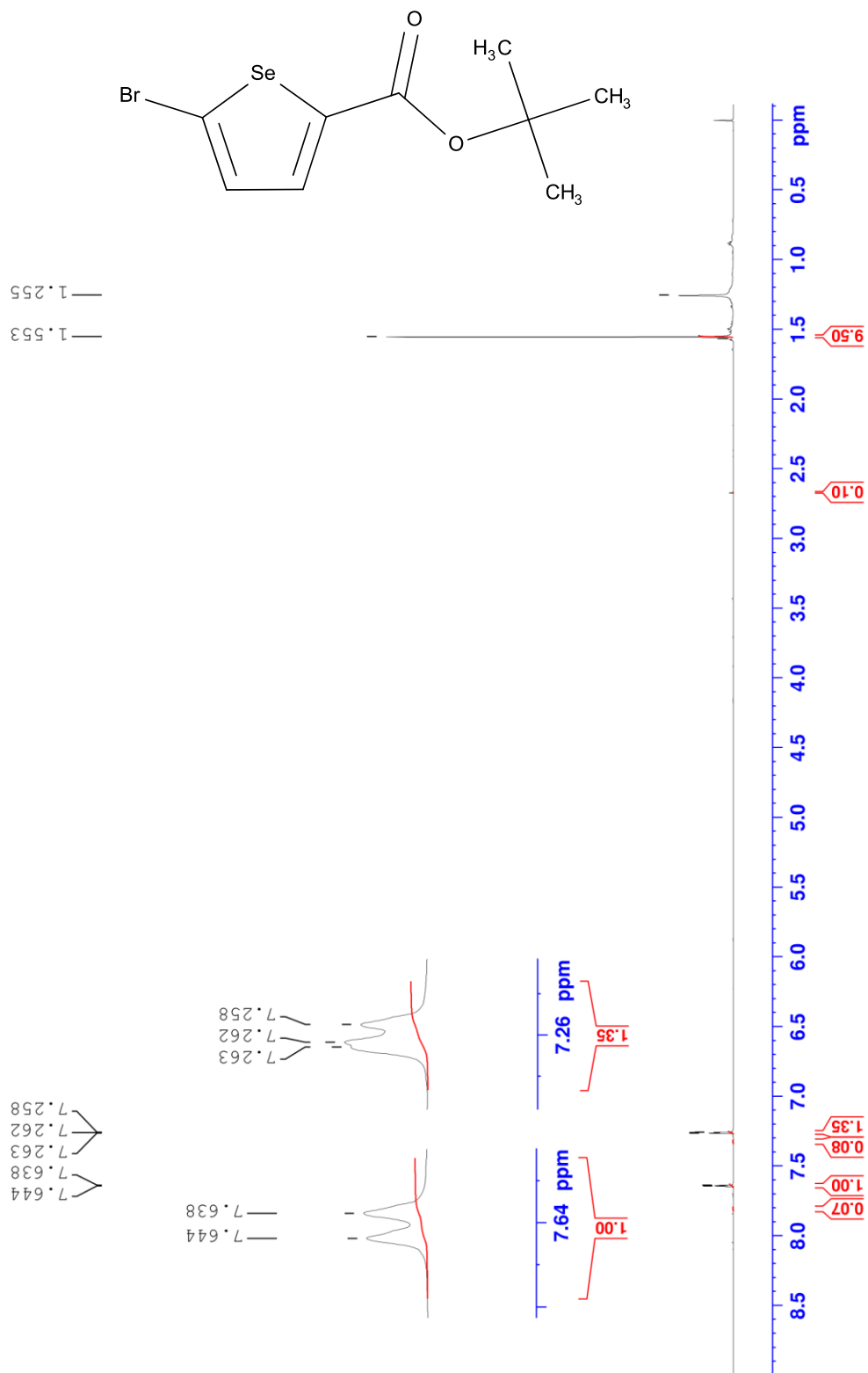


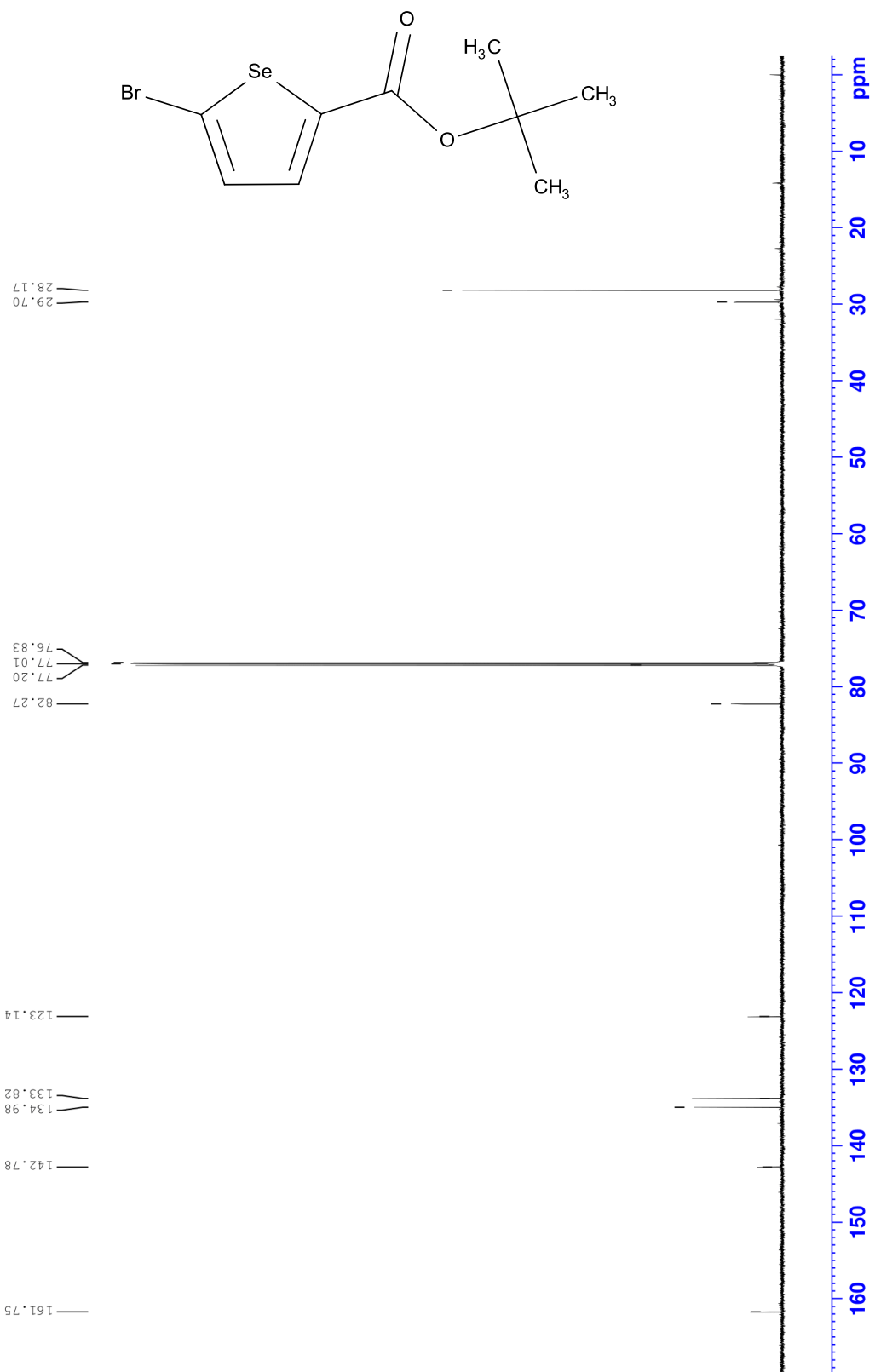
Lisa 3. Ühendi 4  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



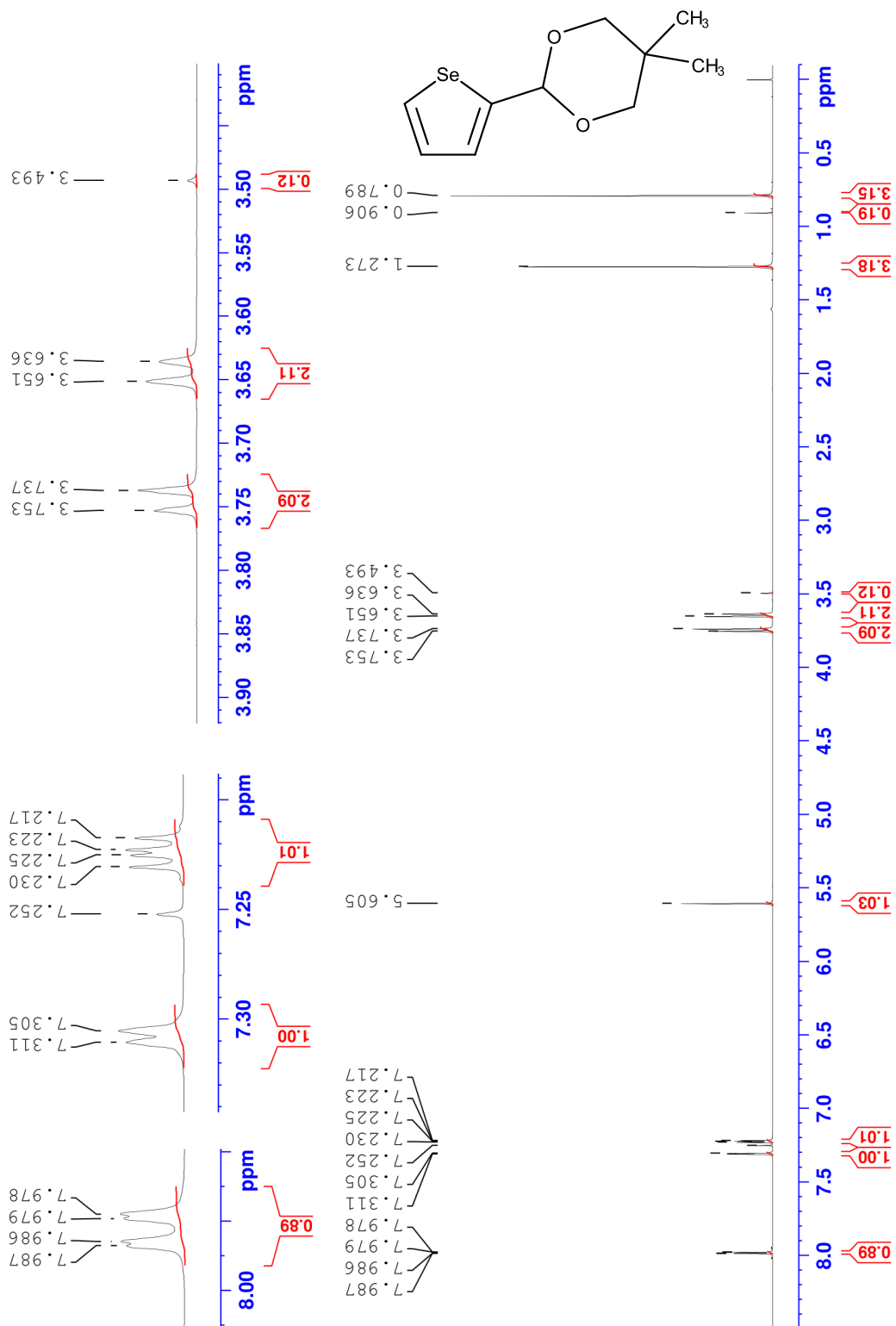


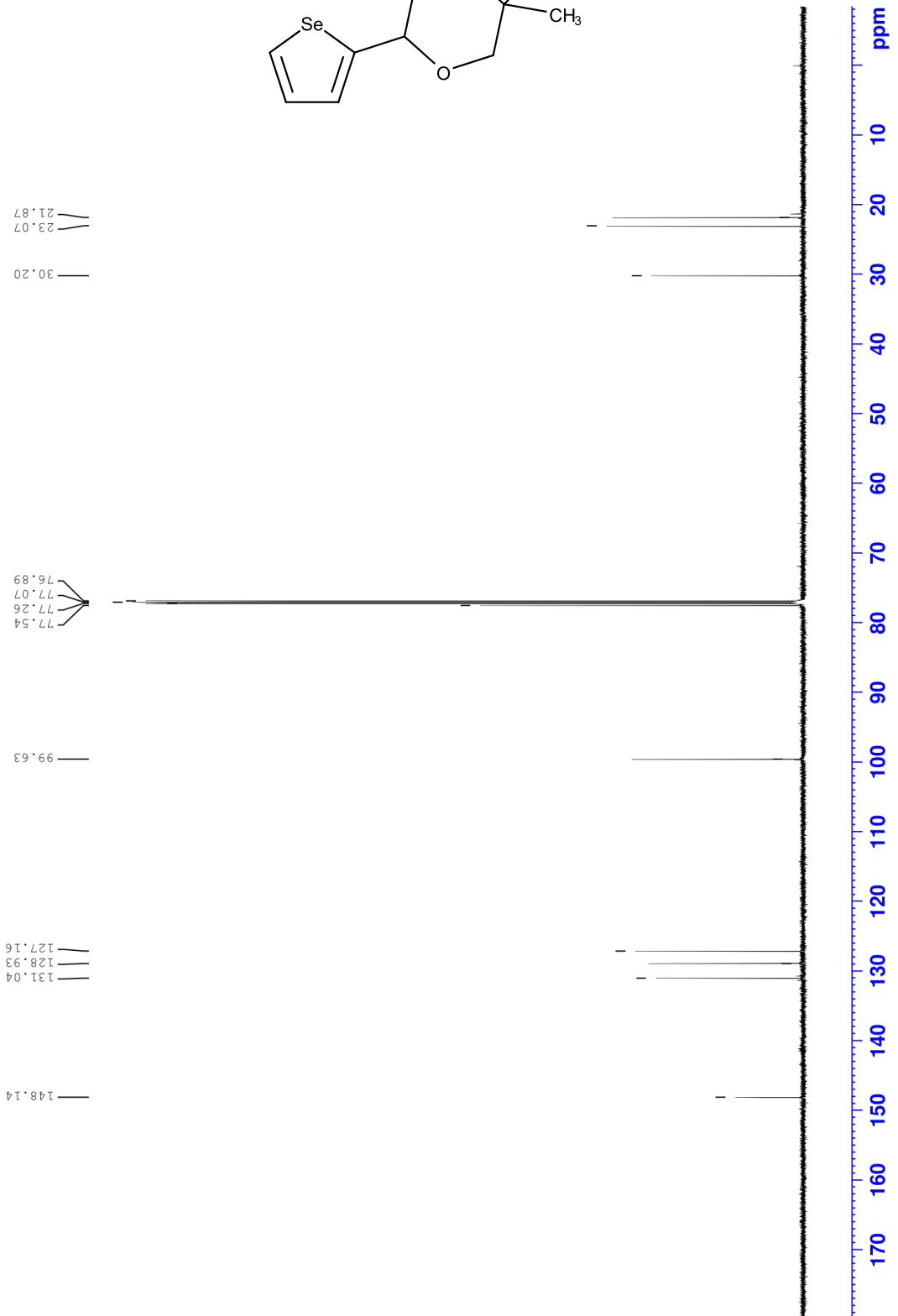
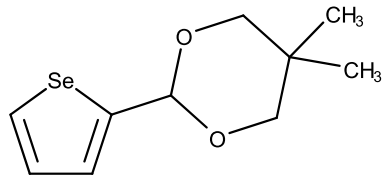
Lisa 4. Ühendi 5  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



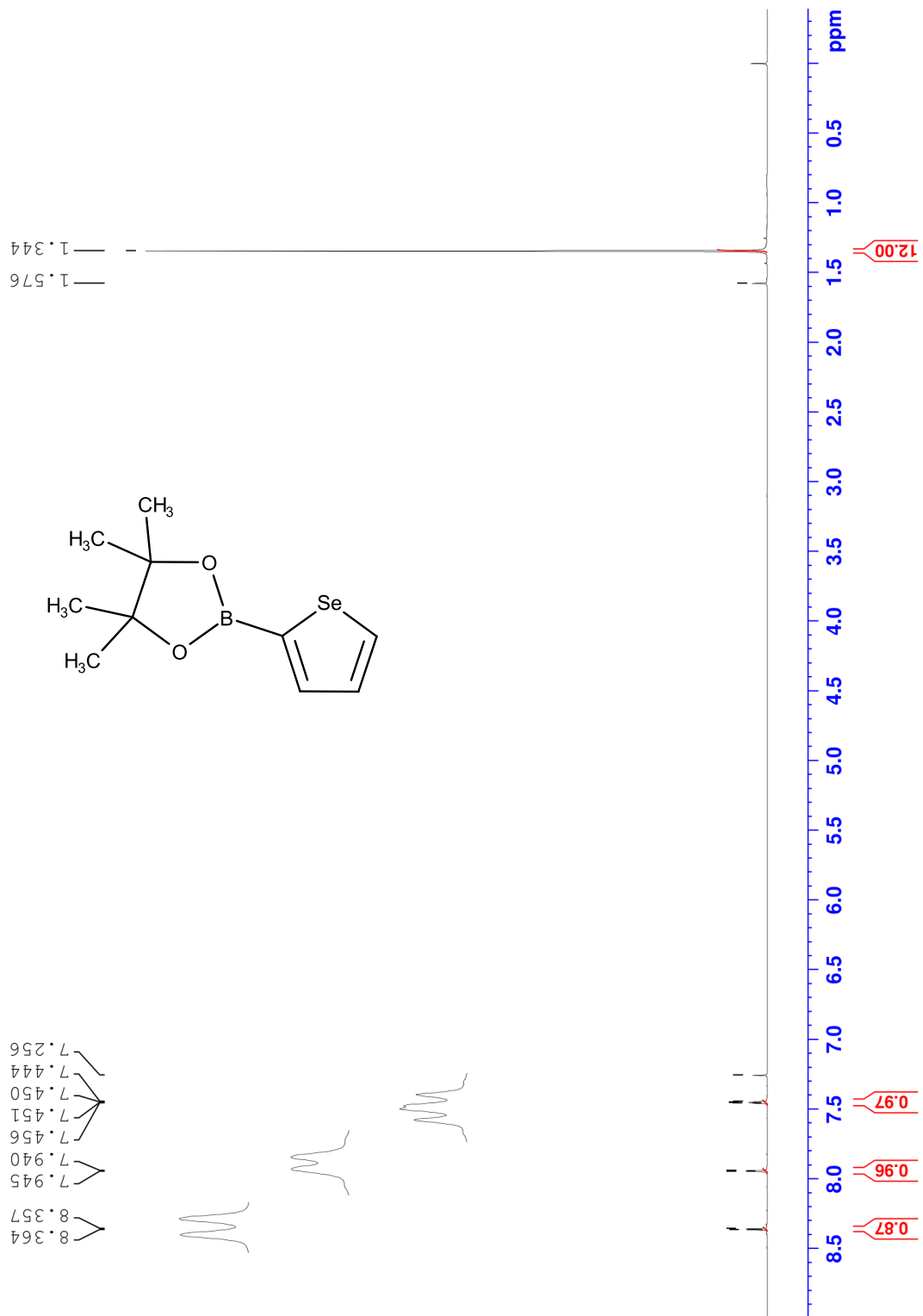


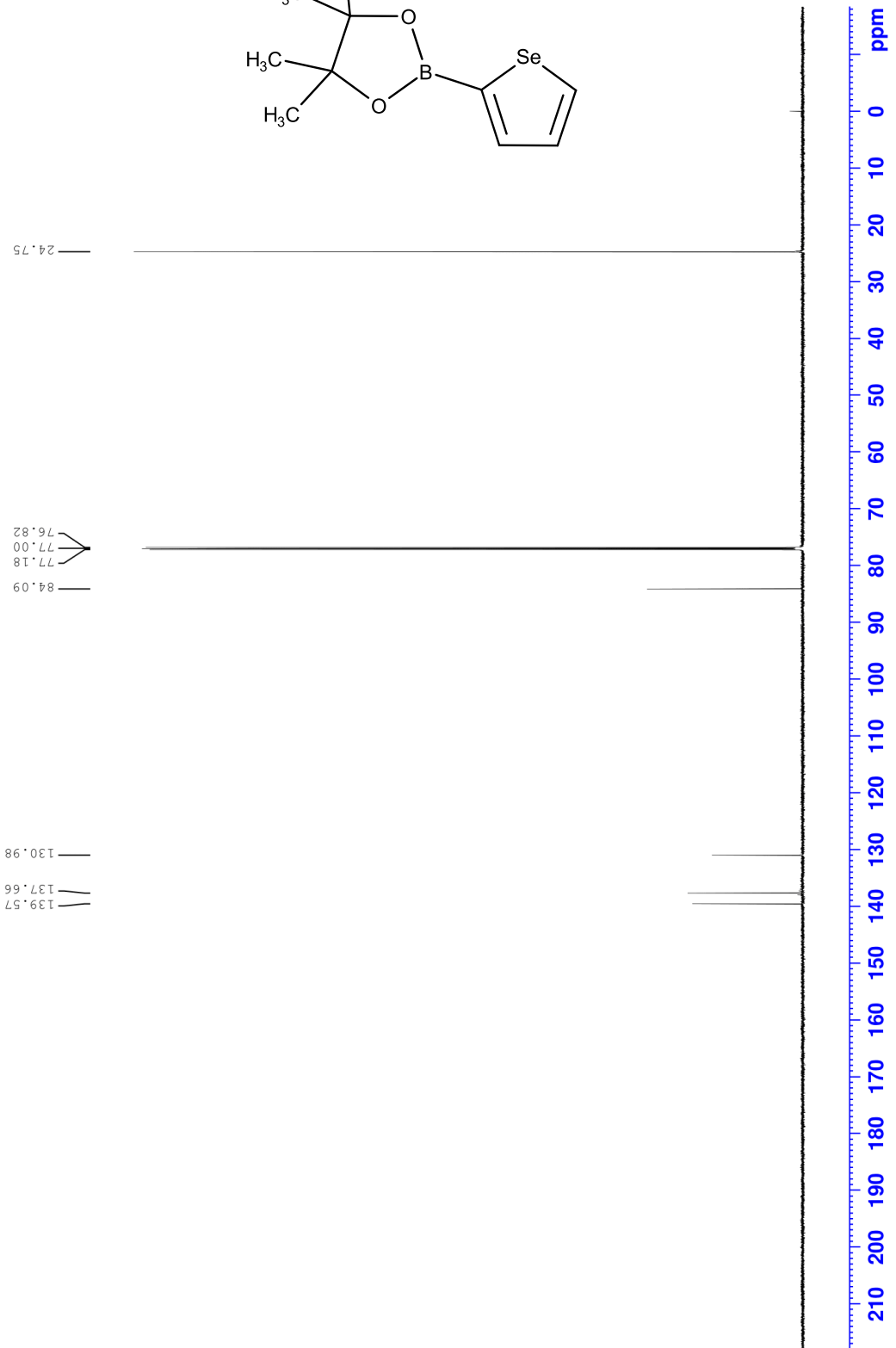
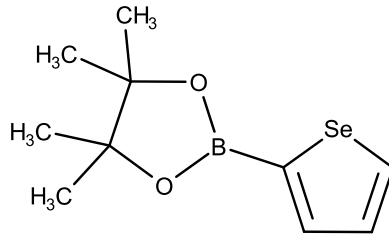
Lisa 5. Ühendi 7  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



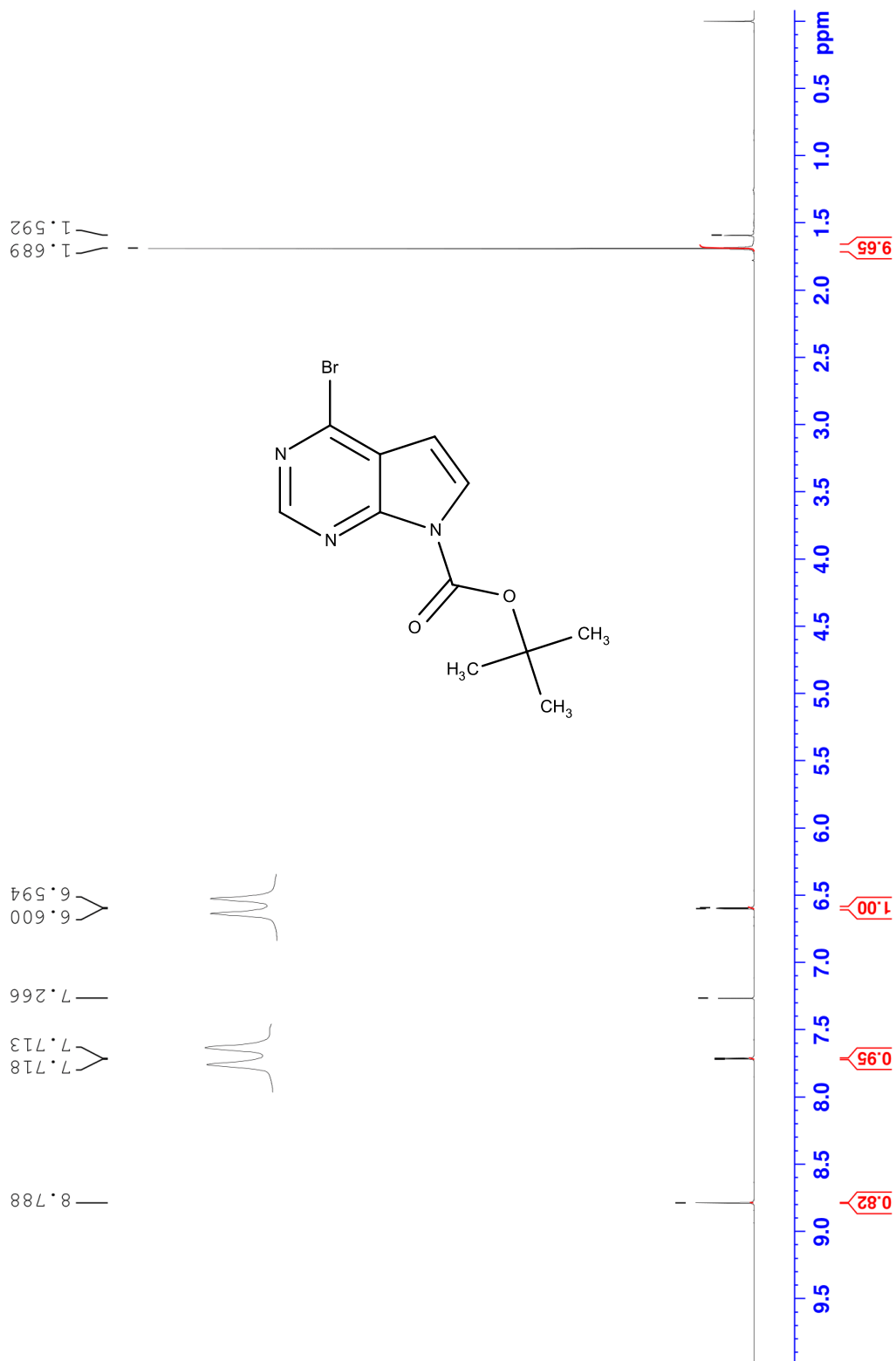


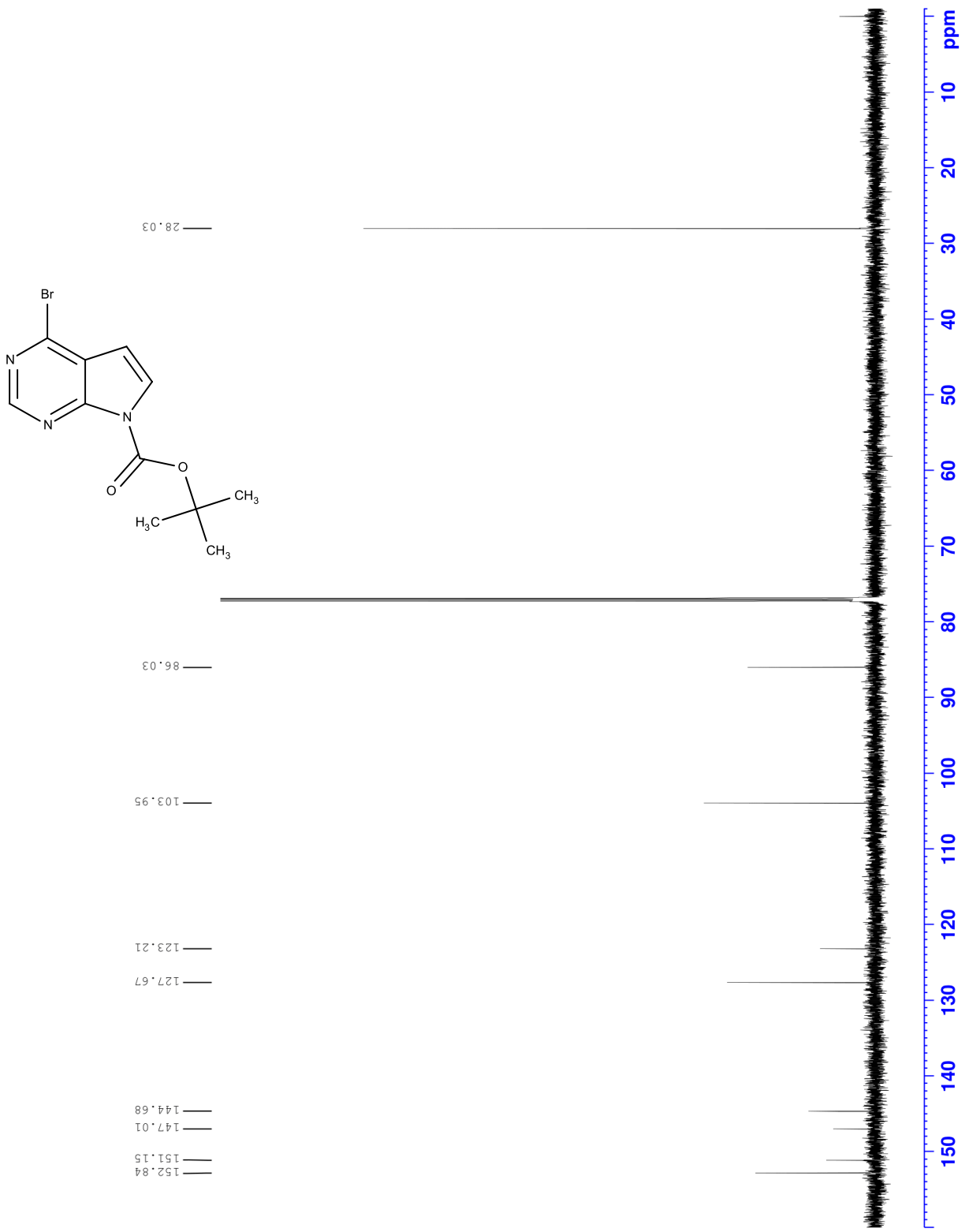
Lisa 6. Ühendi 1  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



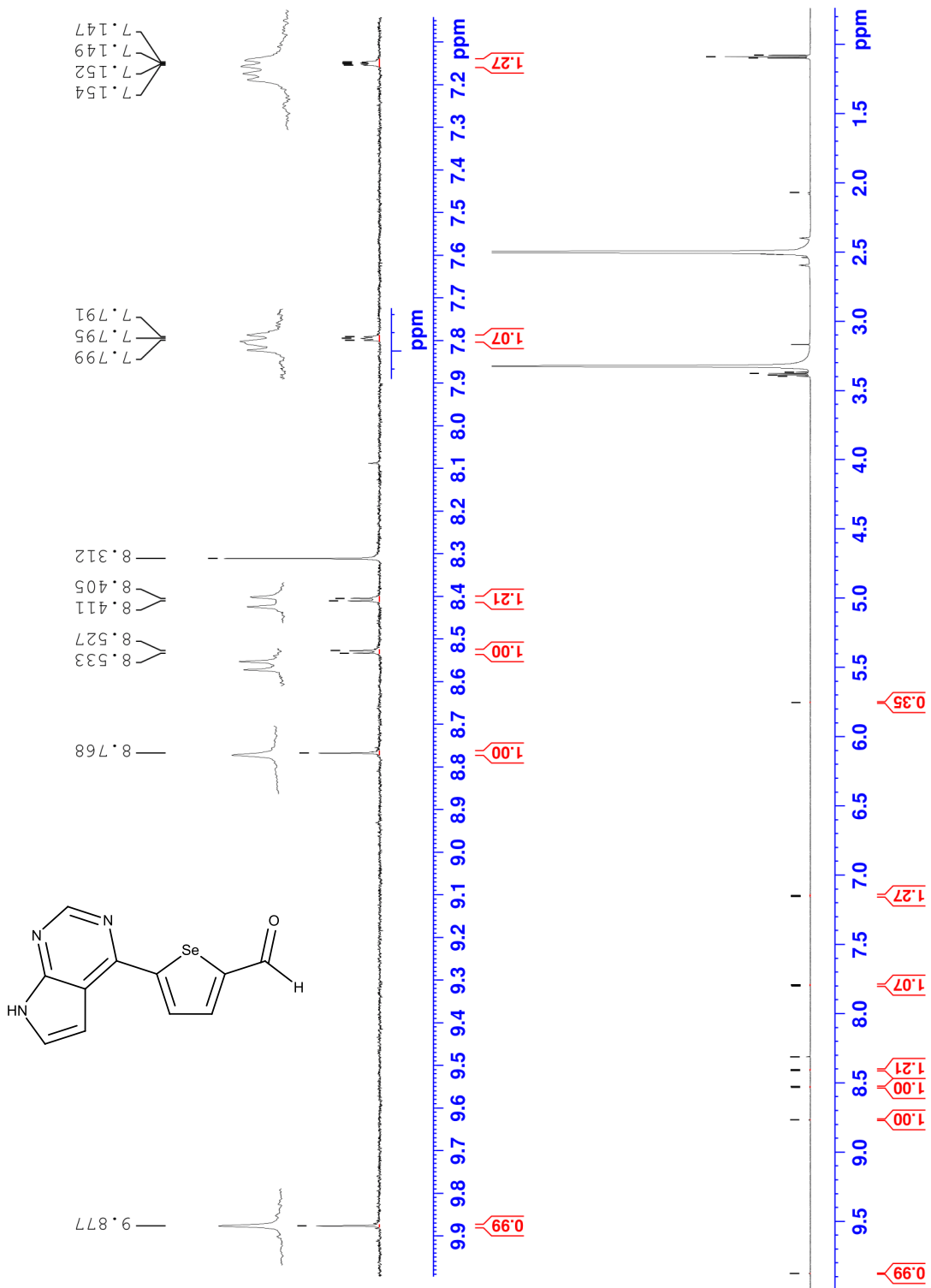


Lisa 7. Ühendi 6  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).

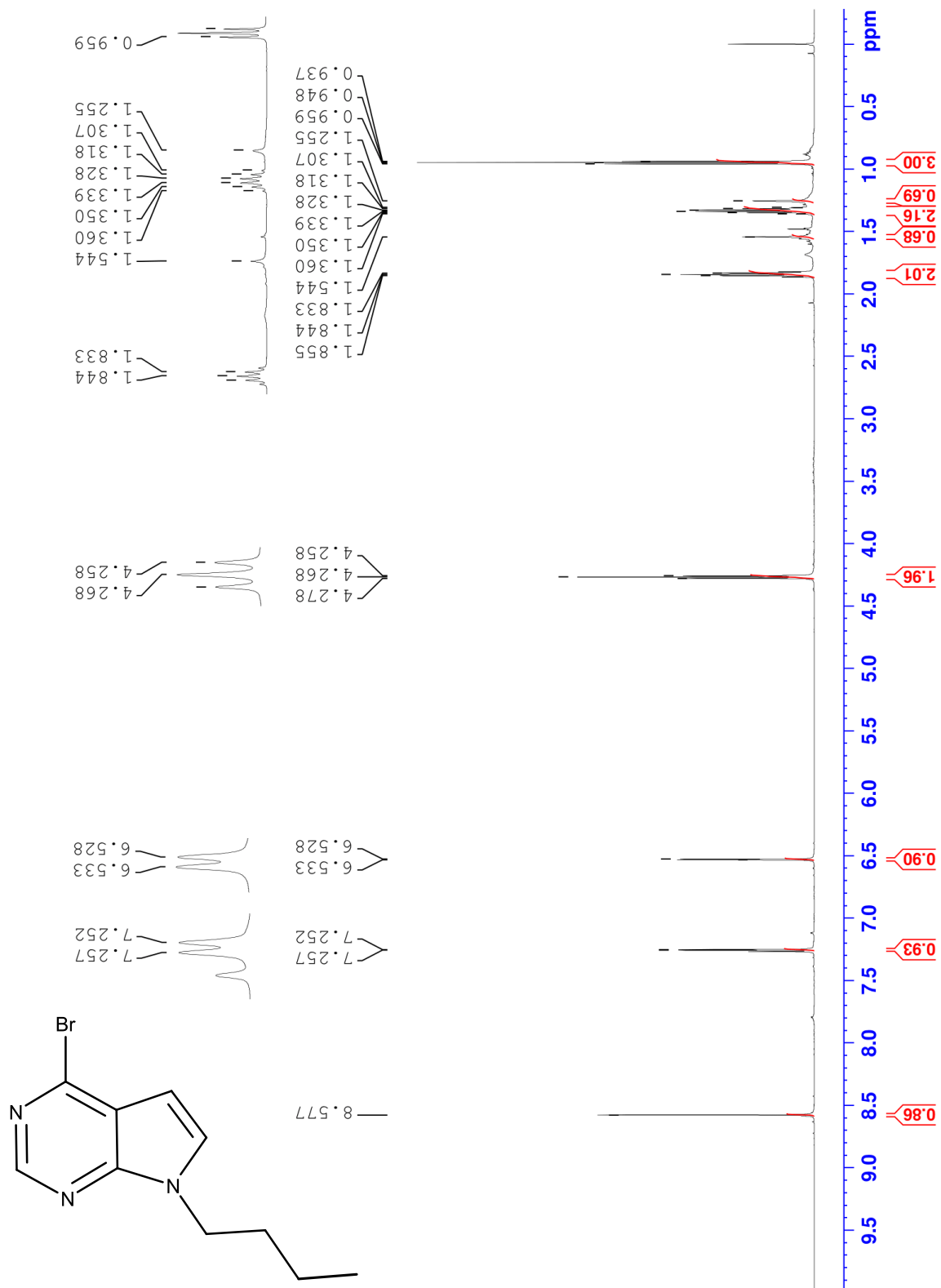


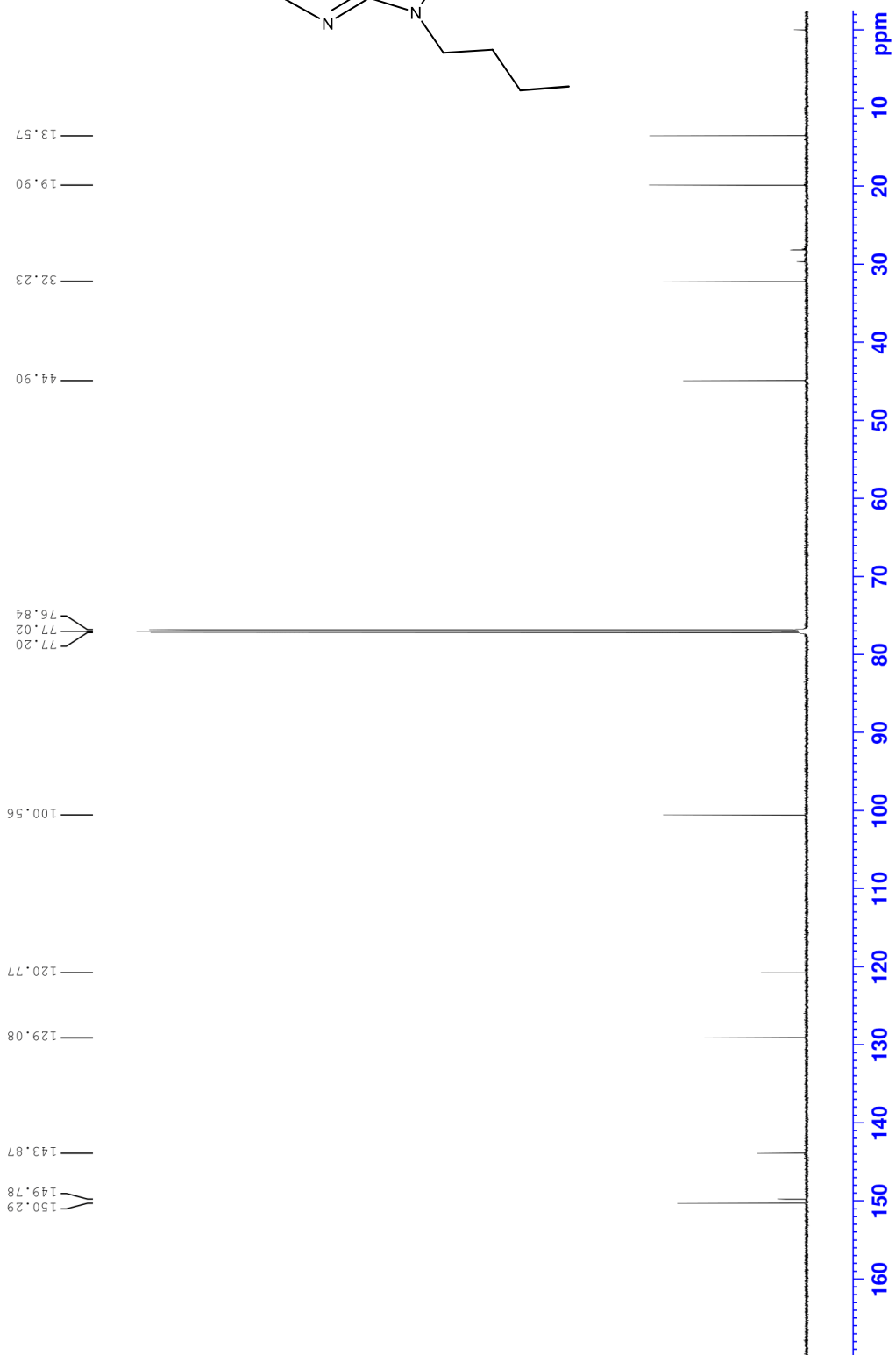
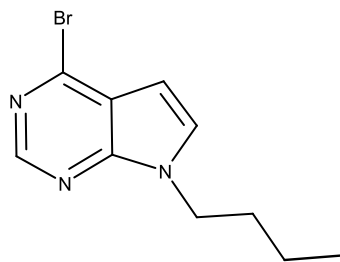


Lisa 8. Ühendi 10 <sup>1</sup>H spekter.

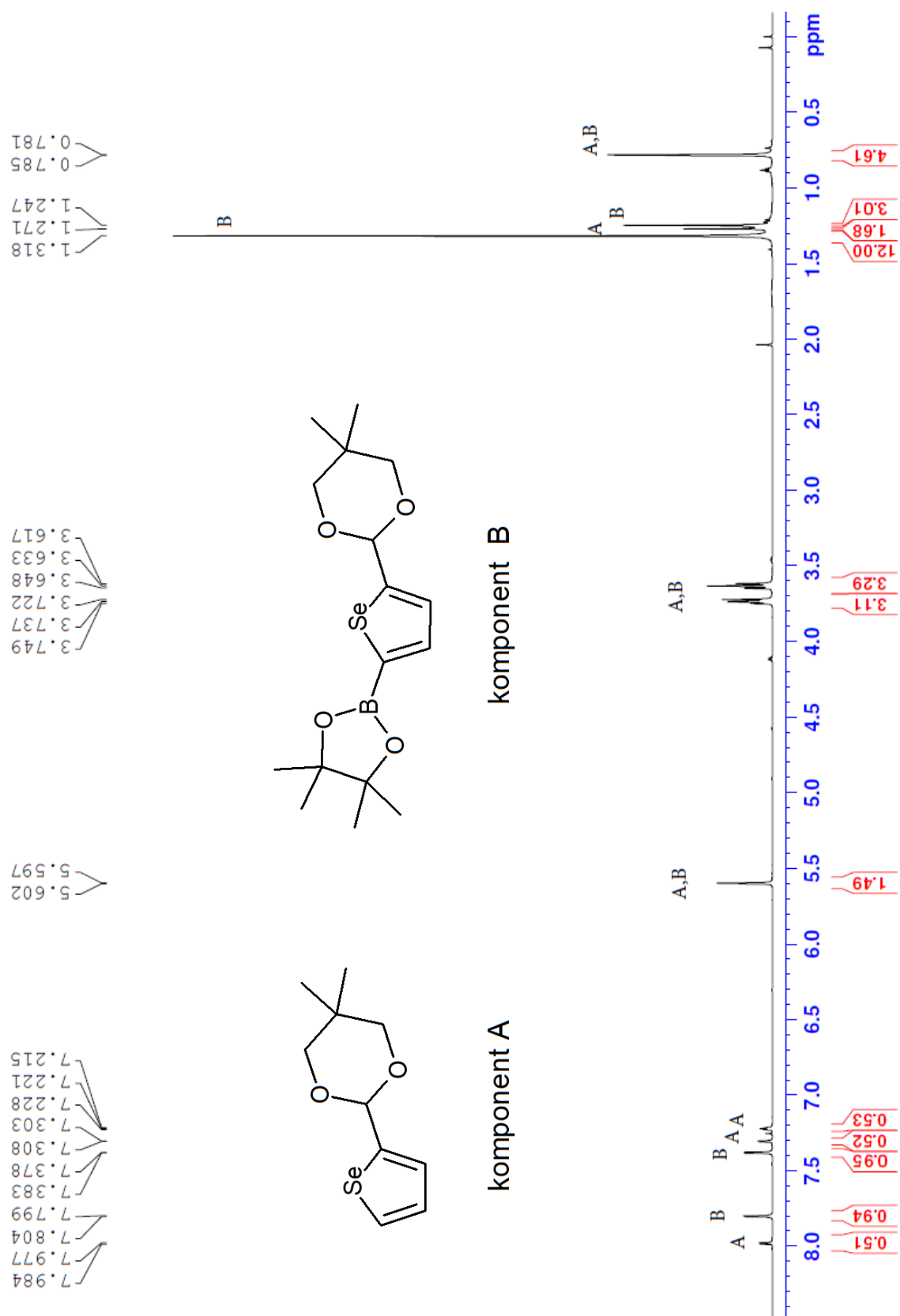


Lisa 9. 6-bromo-9-butüüleasapuriini  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).

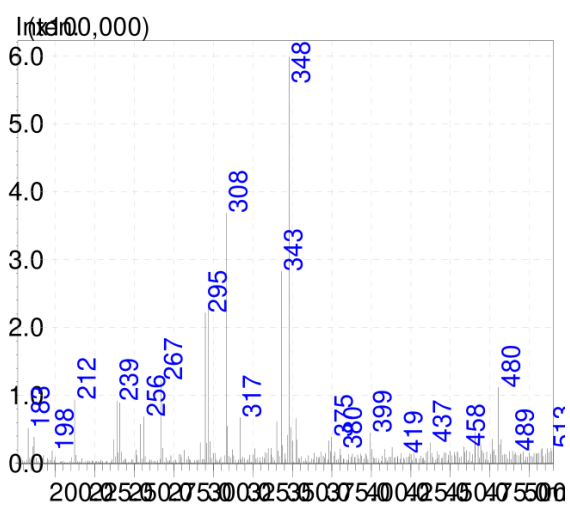
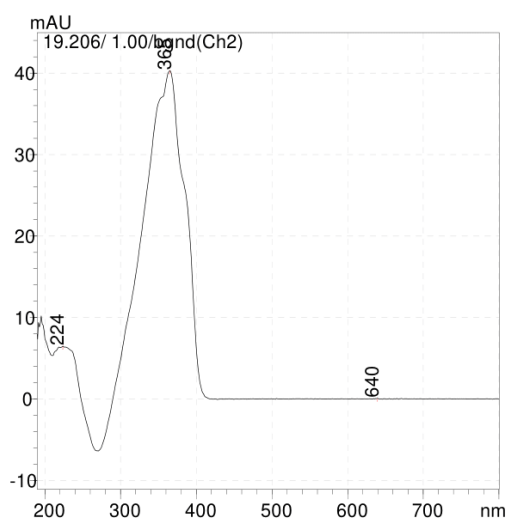
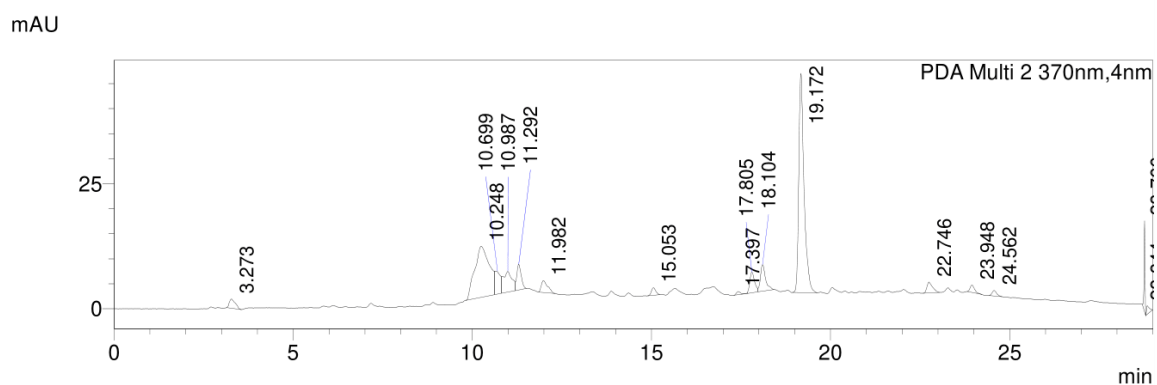
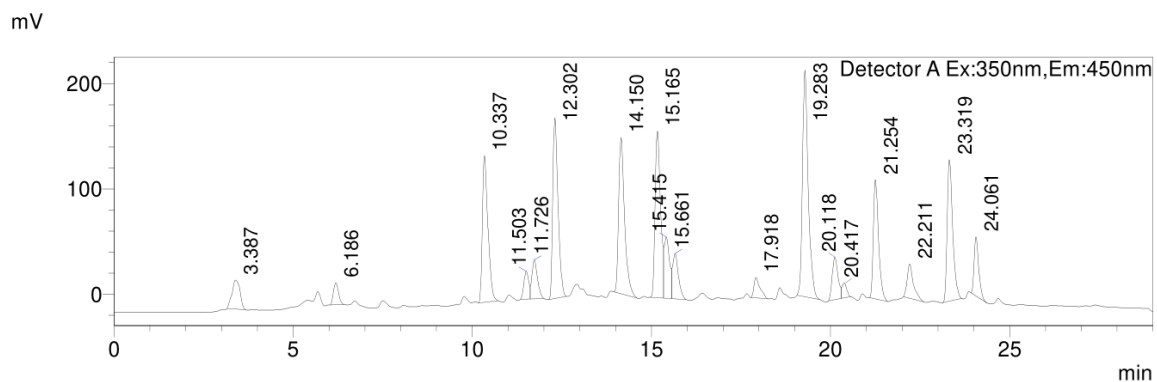




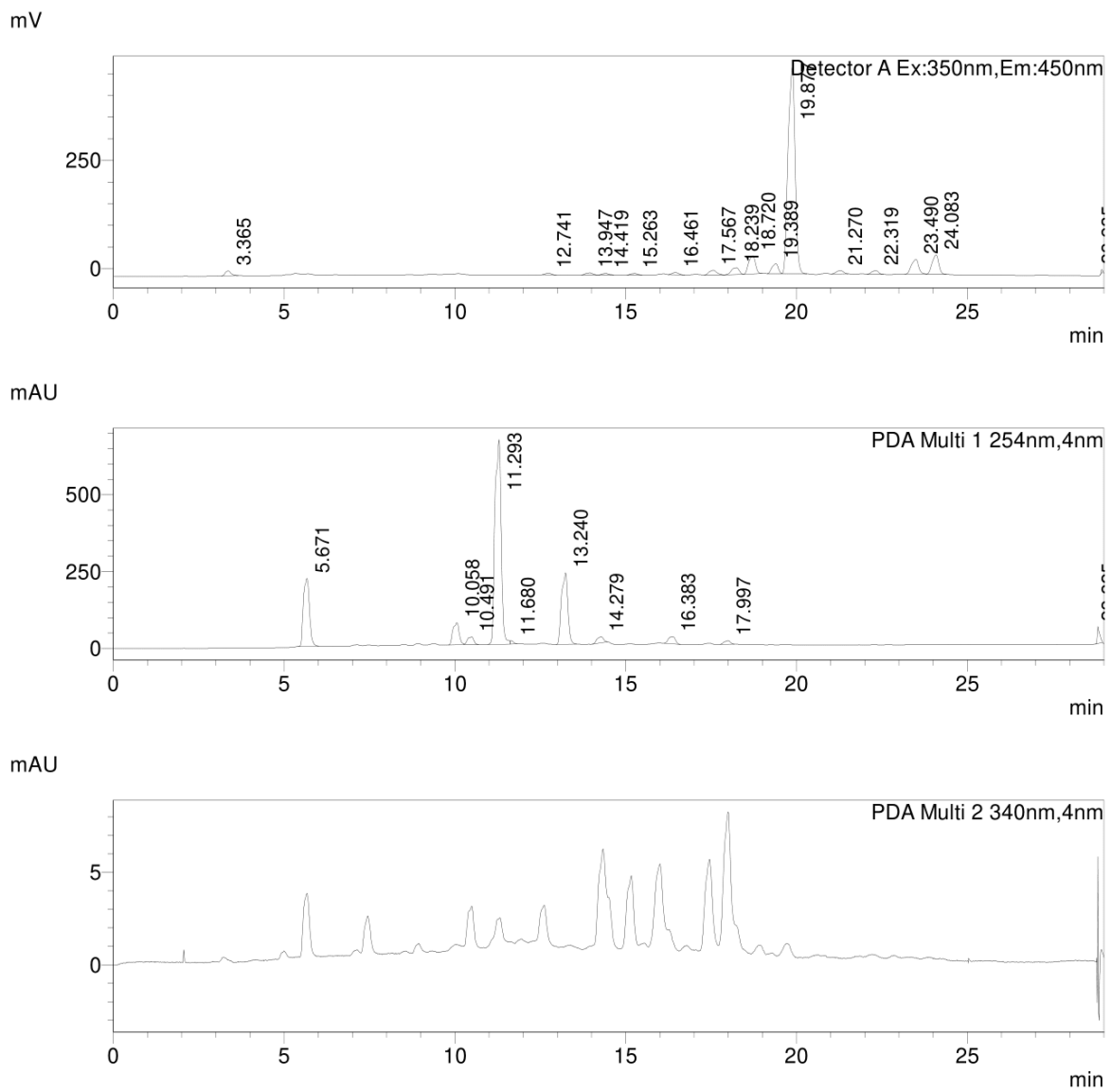
Lisa 10. Ühendi 8  $^1\text{H}$  spekter.



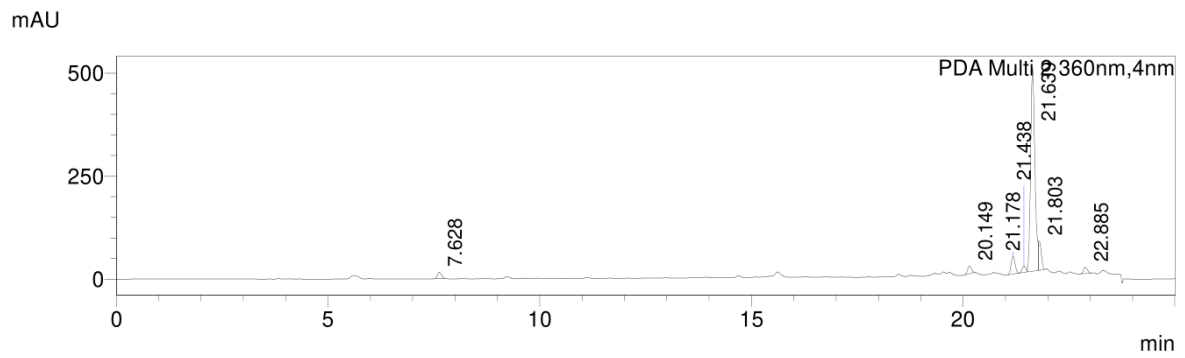
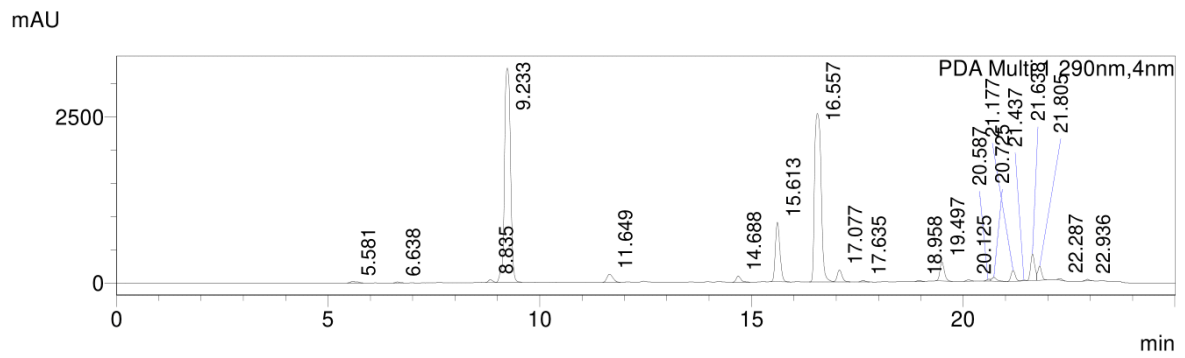
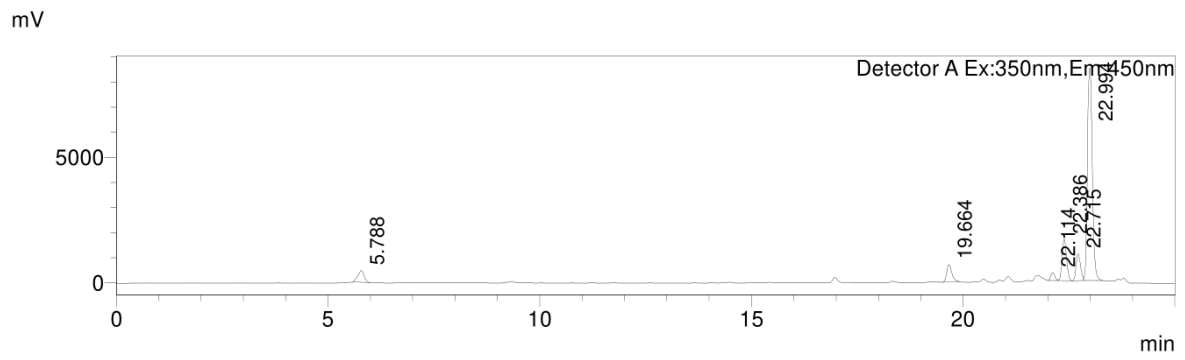
**Lisa 11.** Sünteesirada II; VIIa reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

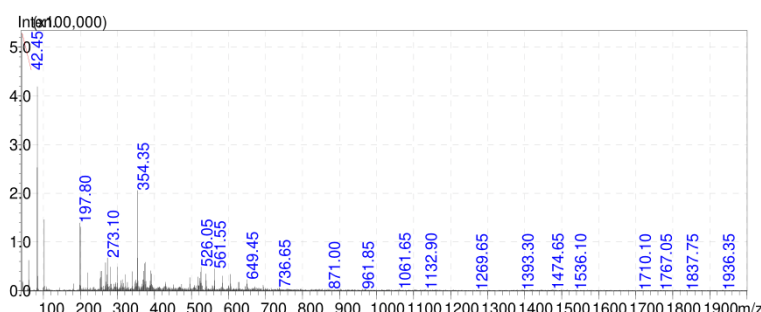
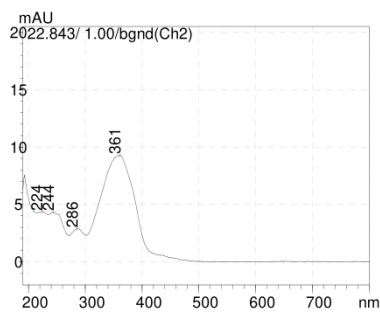
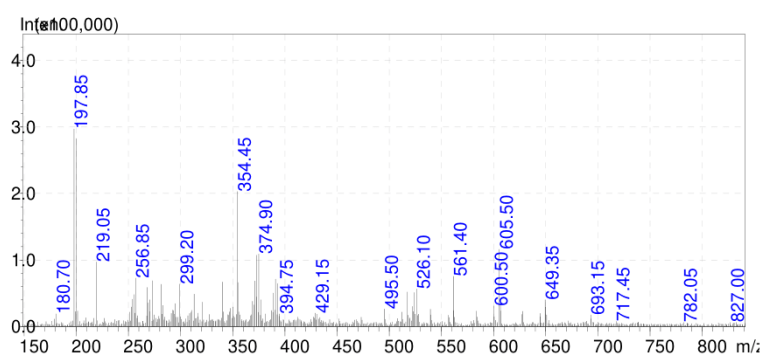
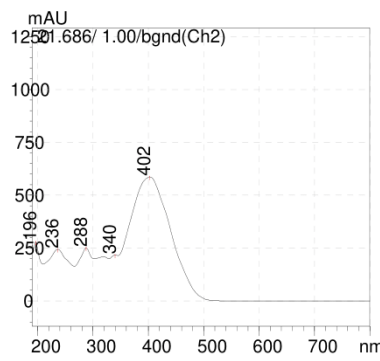
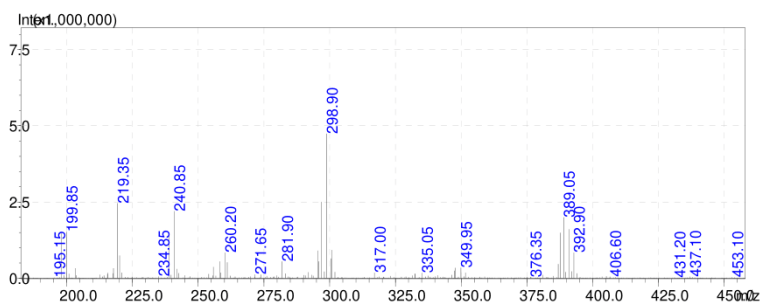
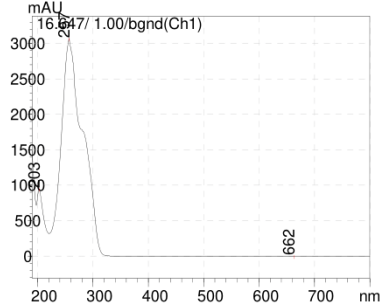
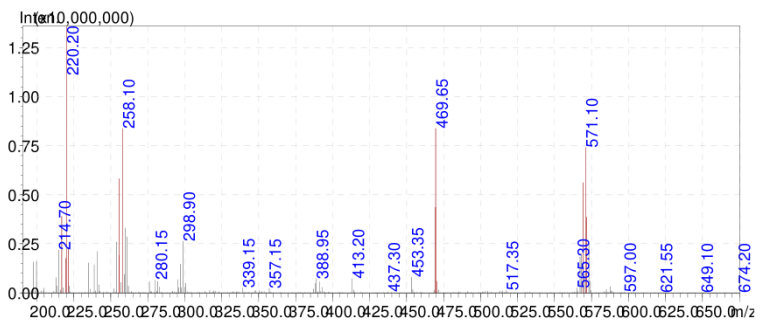
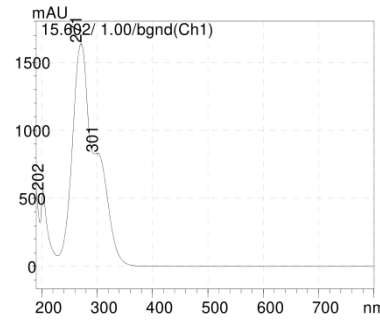
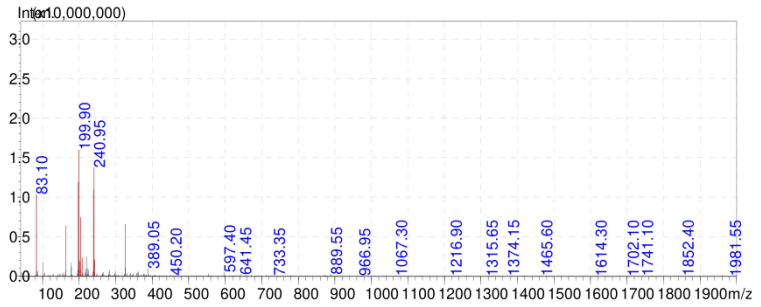
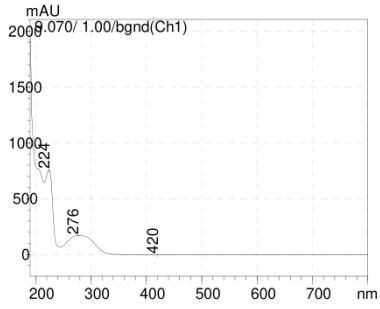


**Lisa 12.** Sünteesirada II; VIIb reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

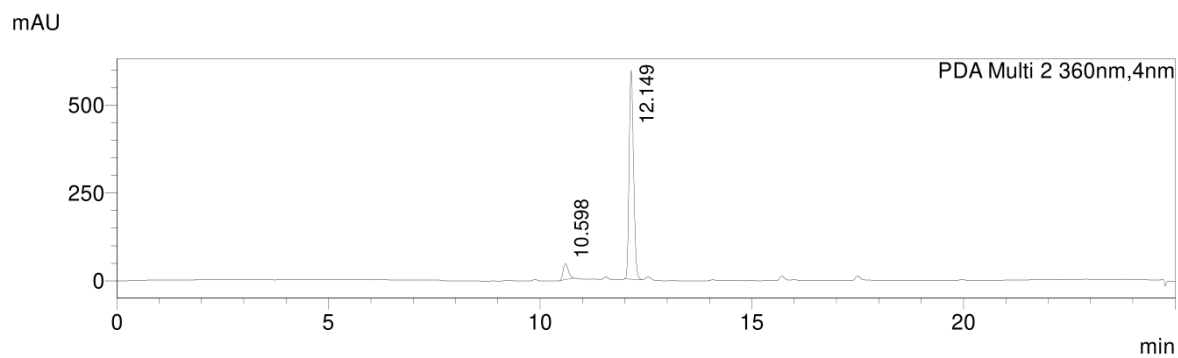
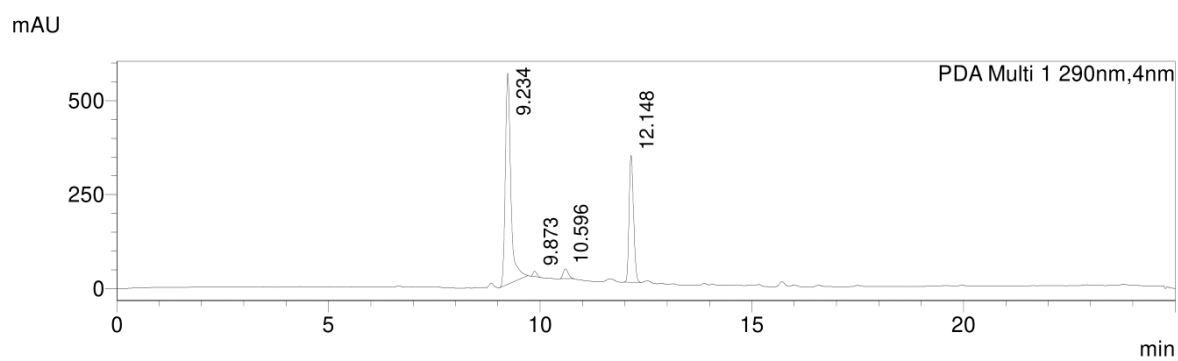
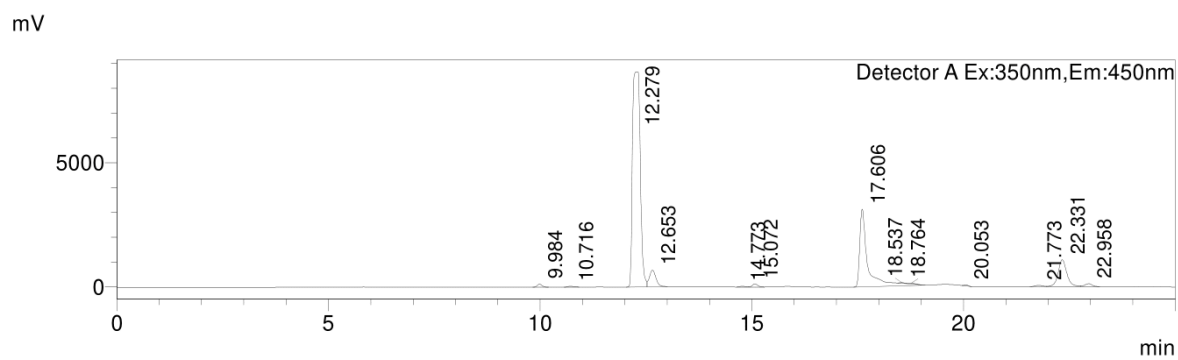


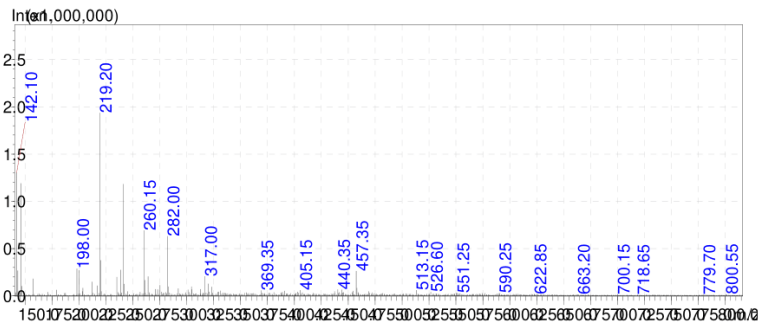
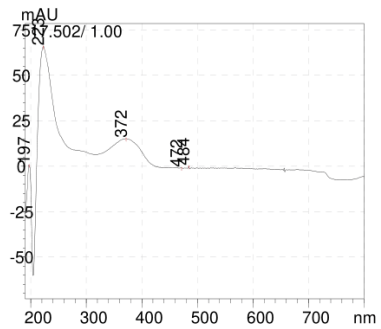
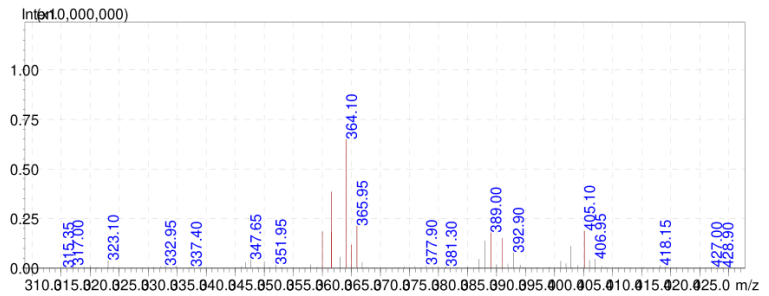
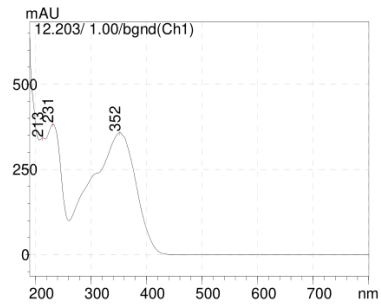
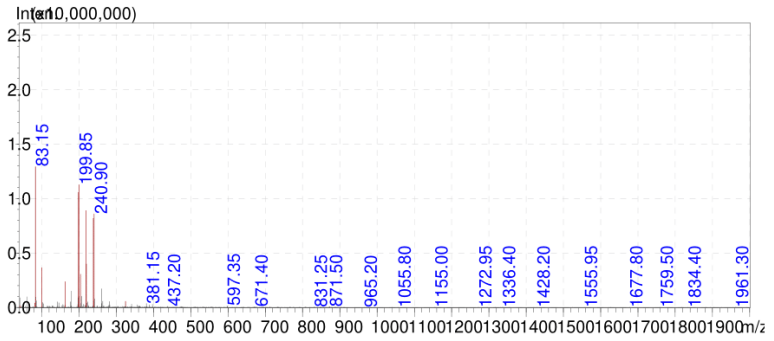
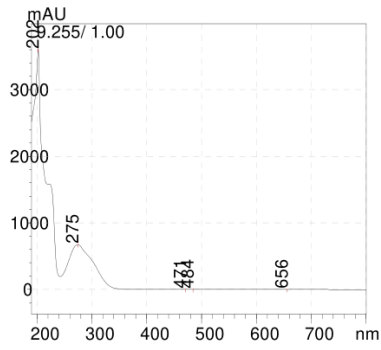
**Lisa 13.** Sünteesirada II; VIIC reaktsioon. HPLC-MS analüüs (kahel lehel).



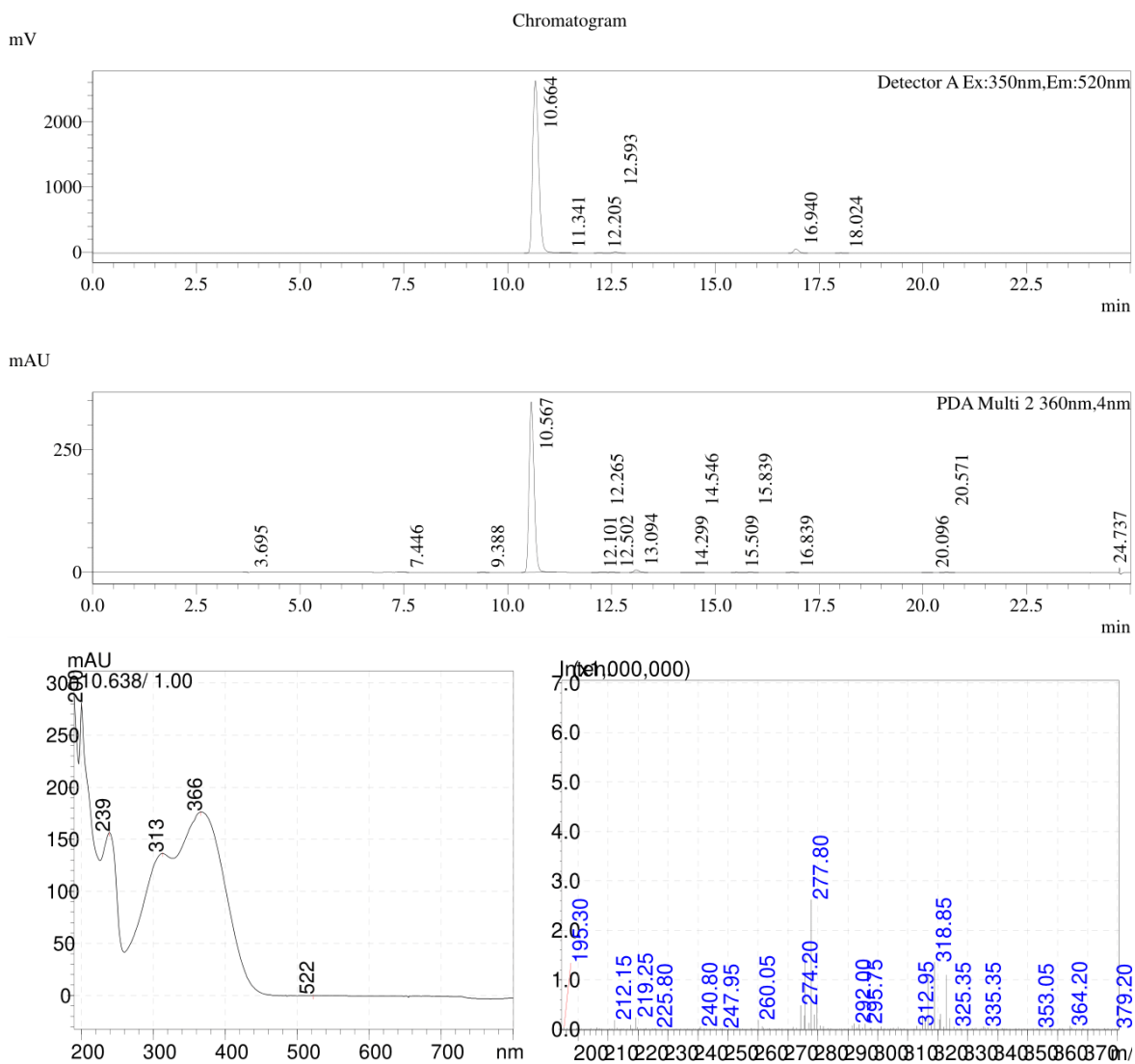


**Lisa 14.** Sünteesirada III; III reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs (kahel lehel).



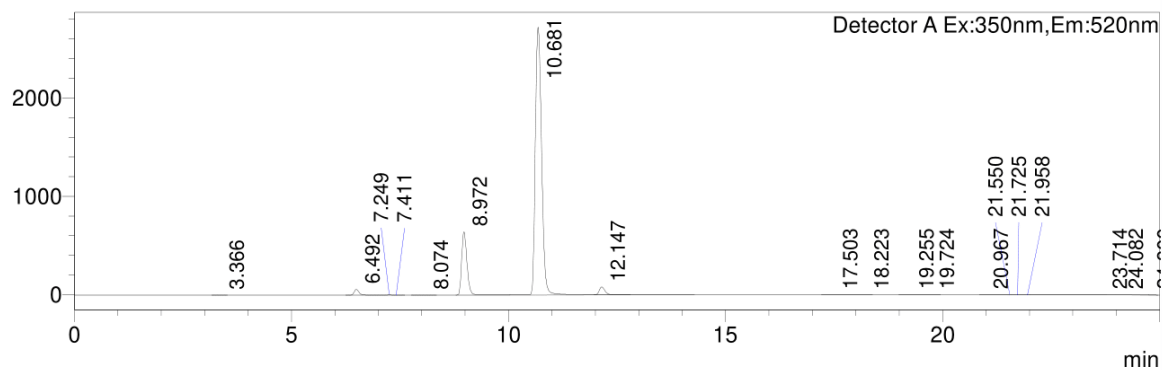


**Lisa 15.** Sünteesirada III; IV reaktsioon. Toorsegu HPLC-MS analüüs.

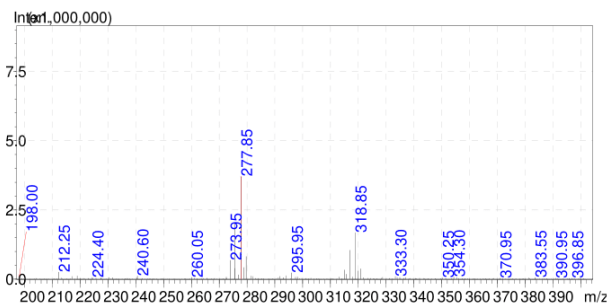
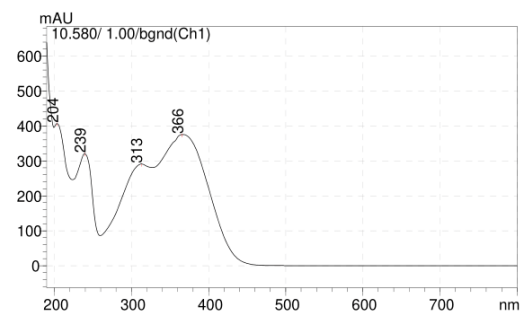
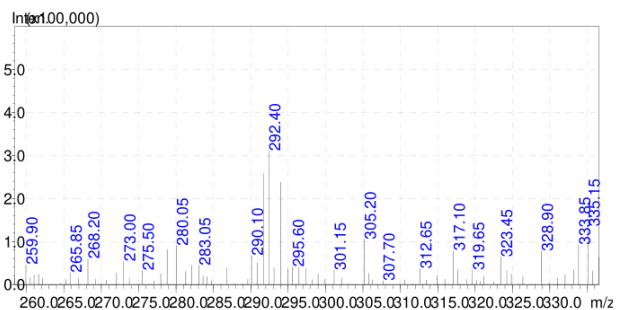
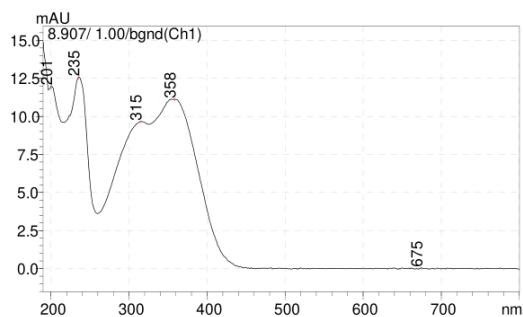
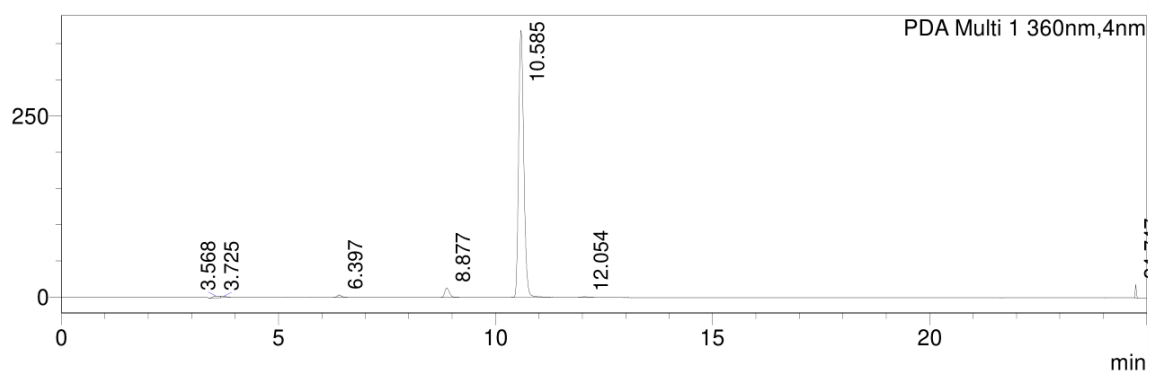


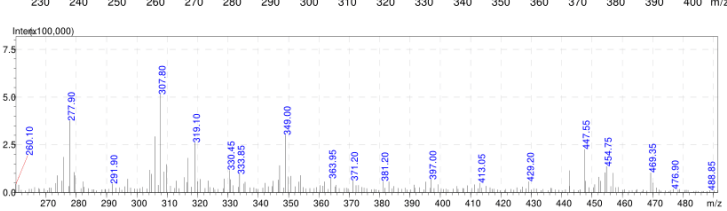
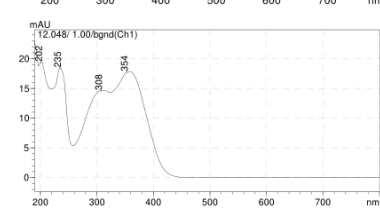
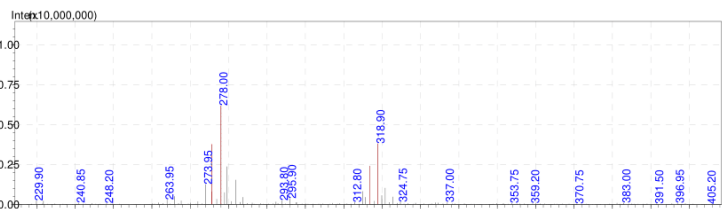
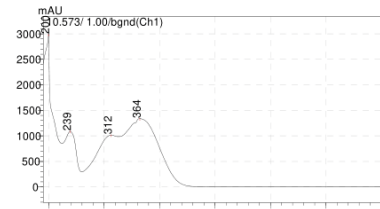
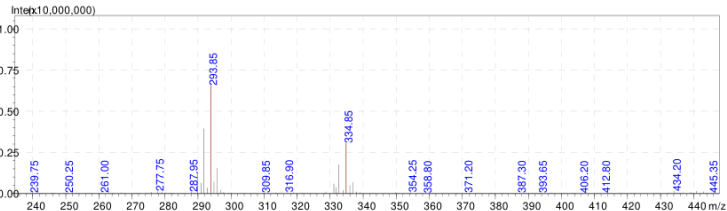
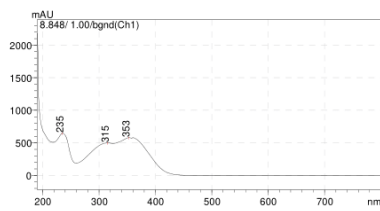
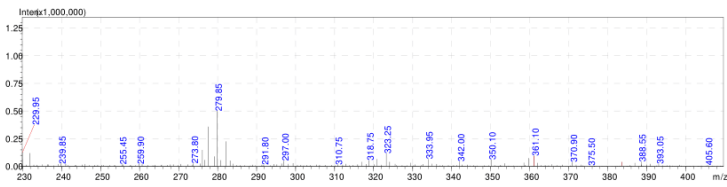
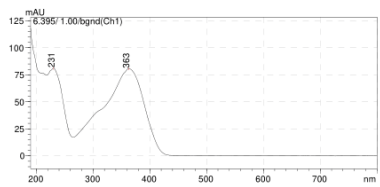
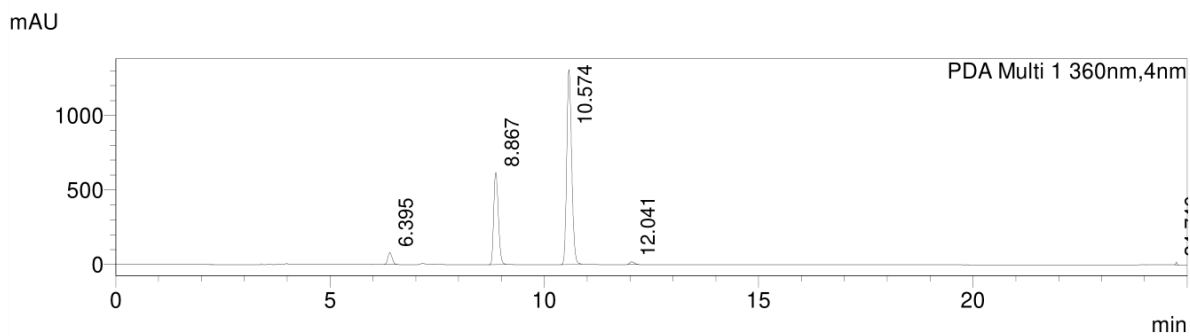
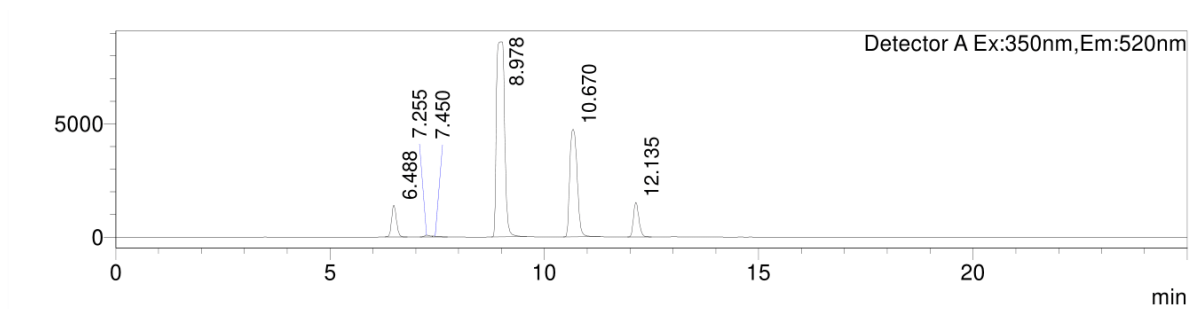
**Lisa 16.** Sünteesirada III; V reaktsioon. Reaktsioonisegu ajahetkedel  $t_1 = 3$  h,  $t_2 = 24$  h,  $t_3 = 96$  h (kolmel eri lehel).

mV

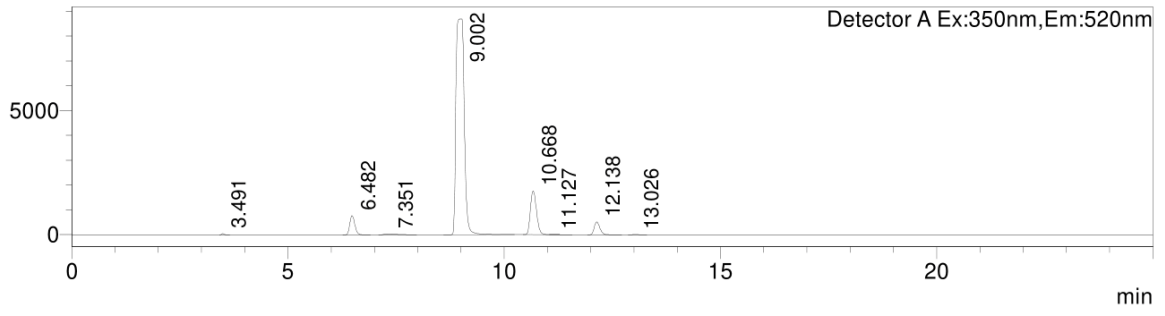


mAU

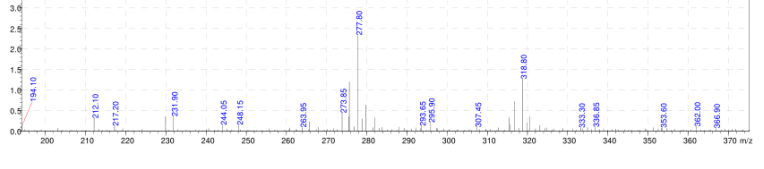
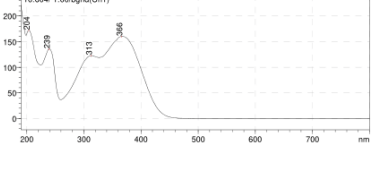
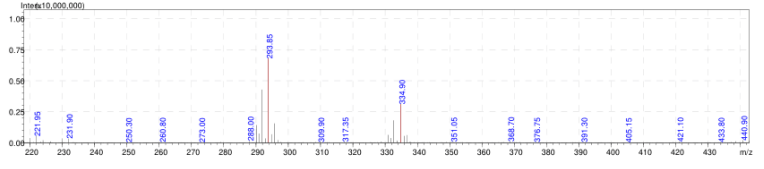
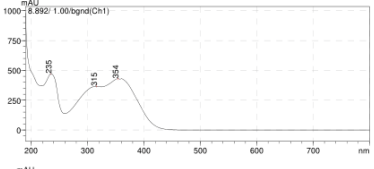
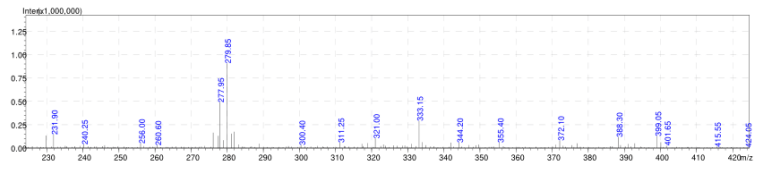
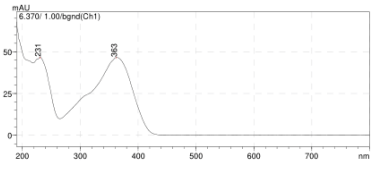
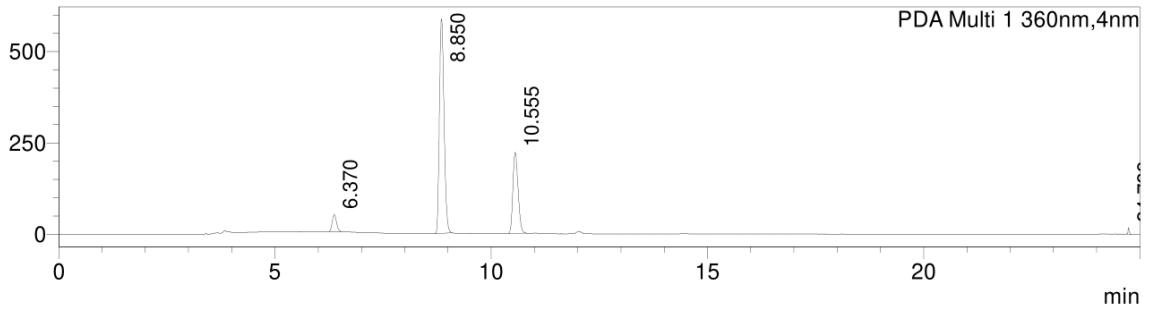




mV



mAU



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

Mina, Eva Lea Jääger,

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

### **Selenofeeni ja deasapuriini sisaldava ühendi süntees proteiinkinaaside fotoluminestsentssondide arendamiseks,**

mille juhendajad on Kaido Viht ja Tanel Sõrmus,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 01.06.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Eva Lea Jääger*

**26.05.2021**