

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Kaijus Janis

**Proteiinkinaasi CK2 bisubstraatse inhibiitori ARC-772 struktuuri  
varieerimine**

Magistritöö (30 EAP)

Keemia

Juhendaja: Kaido Viht, PhD

Tartu 2022

## **Proteiinkinaasi CK2 bisubstraatsed inhibiitori ARC-772 struktuuri varieerimine**

Proteiinkinaas CK2 on seotud mitmete oluliste protsessidega rakus, mille abil rakk saab kasvada ning paljuneda. CK2 on ka ravimi sihtmärkkinaas. Näiteks on täheldatud, et CK2 inhibeerimine omab toetavat mõju vähivastases teraapias. CK2 inhibiitorid on katsetamisel ka COVID19-vastaste ravimitena. Tartu Ülikoolis arendatavad bisubstraatsed CK2 inhibiitorid, näiteks ARC-772, on võrreldes monosubstraatsede inhibiitoritega afiinsemad ning selektiivsemad CK2 suhtes.

Käesolevas töös lihtsustati ARC-772 sünteesirada ning uuriti mõnede struktuursete modifikatsioonide mõju inhibiitorite võimele CK2-ga seonduda. Uuritud struktuuri variatsioonid märkimisväärset mõju ühendite inhibeerimisvõimekusele ei omanud. See näitab, et antud tüüpi inhibiitorite disainil on küllaltki palju vabadust, mis võimaldab muuta ühendi teisi omadusi, näiteks võimet siseneda elusrakku.

**Märksõnad:** ensümolooogia, inhibiitorid, proteiinkinaas CK2, keemiline süntees

## **Modification of the structure of the protein kinase CK2 bisubstrate inhibitor ARC-772**

Protein kinase CK2 plays an essential role in many important processes in a cell, which helps the cell grow and proliferate. CK2 is also a drug target. It has been shown that inhibition of CK2 contributes to the anticancer effect of chemotherapeutic agents. In addition, inhibitors of CK2 are being tested as anti-covid-19 agents in clinical trials. At the University of Tartu, bisubstrate CK2 inhibitors are developed. An example of these structures is ARC-772. These inhibitors have improved affinity and selectivity if compared to monosubstrate inhibitors.

In the present work, a simplified synthesis scheme of ARC-772 was developed. Also, structural modifications of ARC-772 were synthesized and their ability to bind to CK2 was investigated. It was found that the modifications did not have substantial effect on the affinity. This highlights the flexibility of the structures and shows that the structures of bisubstrate inhibitors of CK2 could be modified to change other properties such as the ability to enter live cells.

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

## Sisukord

|  |    |
|--|----|
| 1. Teema olulisus ja eesmärk .....   | 7  |
| 2. Kirjanduse ülevaade .....   | 8  |
| 2.1. Proteiinkinaasid .....  | 8  |
| 2.2. Proteiinkinaas CK2 .....  | 9  |
| 2.3. Proteiinkinaas CK2 inhibiitorid .....   | 11 |
| 2.4. ARC-tüüpi proteiinkinaas CK2 inhibiitorid .....   | 13 |
| 2.4. Fluorestsentsi anisotroopia .....   | 15 |
| 2.5. Fotoluminestsents .....   | 16 |
| 2.6. Aegviivitusega luminescentsi mõõtmine .....   | 17 |
| 2.7. Tahkefaassüntees .....  | 18 |
| 2.8. Sekundaarse amiini sünteesistrateegiad .....  | 21 |
| 3. Eksperimentaalne osa .....  | 24 |
| 3.1. Kasutatud kemikaalid .....  | 24 |
| 3.2. Kasutatud aparatuur .....   | 24 |
| 3.3. Sünteesieeskirjad .....   | 25 |
| 3.3.1. 12-aminododekaanhappe metüülestri vesinikloriidhappe soola (1) süntees .....  | 25 |
| 3.3.2. 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe metüülestri (2) süntees ...  | 26 |
| 3.3.3. 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe (Ns-aminododekaanhape, 3) süntees .....  | 27 |
| 3.3.4 5-(klorometüül)-2-(trifenüülmetüül)-2H-tetrasooli (ClCH <sub>2</sub> -tetrasool-Trt, 4) süntees .....  | 28 |
| 3.3.5. 4-(2-amino-1,3-tiasol-4-üül)-N-{2-[(tert-butüüldimetüülsilüül)oksü]etüül}bensamiidi (TBDMS-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-ATB) (5) süntees ..... | 28 |
| 3.3.6. ARC-809 – ARC-812 süntees .....   | 29 |
| 3.3.7. ARC-813 – ARC-815 süntees .....   | 30 |
| 3.3.8. 5-(3-kloroanilino)-N-(2-hüdroksüetüül)benso[c][2,6]naftüridiin-8-karboksamiidi (6) süntees .....  | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4. Aktiivse proteiinkinaasi CK2 kontsentratsiooni määramine..... | 32 |
| 3.5. Ühendite proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine.....    | 33 |
| 4. Tulemuste arutelu.....  | 34 |
| Kokkuvõte.....   | 42 |
| Kasutatud kirjandus.....   | 43 |
| Lisad.....   | 48 |

## Lühendid

2-CTC – 2-klorotritüülkloriid

ARC – adensiini analoogi ja peptiidi või peptiidianaloogi konjugaat

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

ATP – adensiin-5'-trifosfaat

Boc – *tert*-butüüloksükarbonüülrühm

CK2 – proteiinkinaas CK2, vananenud nimetusega kaseiinkinaas 2

DBU – 1,8-diasabitsüklo[5.4.0]undeka-7-een

DCM – diklorometaan

DIPEA – diisopropüületüülamiin

DMF – dimetüülformamiid

DNA – desoksüribonukleinhape

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

EM – emissioonifilter

ESI LC/MS – elektropihustusionisatsiooni vedelikkromatograafia massispektromeeter

EX – ergastusfilter

Fmoc – 9-fluorenüülmetoksükarbonüül

FP – fluorestsentsi polarisatsioon

GTP – guanosiin-5'-trifosfaat

HATU – 1-[Bis(dimetüülamino)metüleen]-1*H*-1,2,3-triasolo[4,5-*b*]püridiinium 3-oksiid  
heksafluorofosfaat

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

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

HOBt – 1-hüdroksübensotriasool

IC<sub>50</sub> – aine kontsentratsioon, mis inhibeerib 50% algsest aktiivsusest; samuti: aine kontsentratsioon, mis vähendab mõõdetavat signaali pooleni maksimaalsest muutusest konkureeriva seondumise katses

Ida - iminodiäädikhape

iPrOH – isopropanool

MeCN – atsetonitriil

MeOH – metanool

MTBD – 7-metüül-1,5,7-triasabitsüklo[4.4.0]deka-5-een

NMM – *N*-metüülmorfoliin

Ns – 2-nitrobenseensulfonüül

bis-PEG5-hape – 4,7,10,13,16-pentaoksanonadekaandihape

*p*TsOH·H<sub>2</sub>O – *p*-tolueensulfoonhappe monohüdraat

TEA – trietüülamiin

TES – trietüülsilaan

TFA – trifluoroetaanhape

TGL – aeglahutusega luminescentsi mõõterežiim

THF – tetrahüdrofuraan

TLC – õhukese kihi kromatograafia (ingl k. *thin-layer chromatography*)

TMR – tuumamagnetresonantspektroskoopia

## 1. Teema olulisus ja eesmärk

Inimgenoomis leidub 538 proteiinkinaasi kodeerivat geeni. Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad fosforüülrühma ülekannet ATP-lt substraatvalgu seriini, treoniini või türosiini aminohappejäägi hüdroksüülrühmale, millega mõjutatakse substraadi aktiivsust. Substraatvalgu mõjutamise tulemusena kontrollivad proteiinkinaasid mitmeid olulisi protsesse rakkudes, mille hulka kuuluvad metabolism, transkriptsioon, raku liikumine, apoptoos, raku paljunemine ja ellujäämine. Üleekspresseeritud või liigaktiivseid proteiinkinaase seostatakse mitmete haigustega ning muteerunud kinaasid on sageli onkogeneesi alustajaks. Liigaktiivsuse pidurdamiseks on vaja leida inhibiitoreid ehk ühendeid, mis kinaasiga interakteerudes pärsivad selle aktiivsust. Inhibiitorite arendamine on ravimitööstuses tähtsal kohal ning tänaseks on ravimitena kasutusel üle 70 proteiinkinaasi inhibiitori.

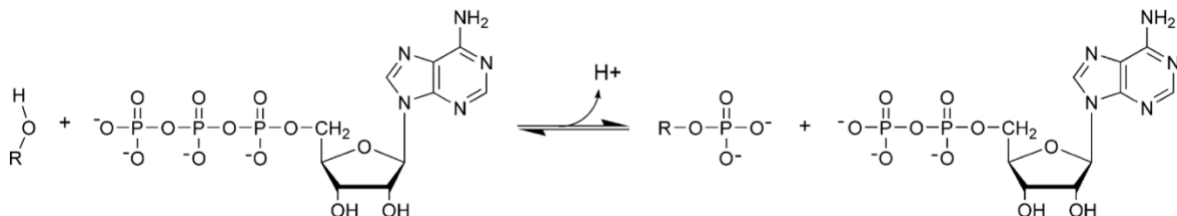
CK2 soodustab vähirakkudes angiogeneesi, mis aitab suurendab vähkkasvaja elujõulisust. Seetõttu on CK2 aktiivsuse pärssimine potentsiaalne suund uutele vähiravimitele. Praeguseks on kliinilistesse katsetesse jõudnud kaks ühendit, mis inhibieerivad CK2-katalüüsivad fosforüülimisreaktsiooni. Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia töögrupis on välja töötatud bisubstraatsed CK2 inhibiitorid (ARC-d), mille struktuuris on ühendatud läbi vahelüli nukleosiidimimikeeriv fragment ning füsioloogilises keskkonnas negatiivselt laetud valksubstraat. Võrreldes monosubstraatsete CK2 inhibiitoritega, seonduvad ARC-d korruga kinaasi mõlemasse aktiivtsentrisse, mille tulemuseks on suurenenud afiinsus ning selektiivsus CK2 suhtes. Fluorestsentsmärgistatud ARC-e saab kasutada inhibiitorite seondumise iseloomustamiseks ning kinaaside kontsentratsiooni määramiseks.

Antud töö lähtub varempubliceeritud bisubstraatses inhibiitorist ARC-772. Töö eesmärk on lihtsustada ARC-772 sünteesirada, mis võimaldaks lihtsasti varieerida struktuuris paikneva vahelüli küljes olevat ahelat; samuti näidata, kuidas muutub inhibiitori võime seonduda proteiinkinaasiga CK2, kui struktuuris teostada karboksüülrühmade asendamist teiste rühmadega.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1. Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis katalüüsivad  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekannet adenosiin-5'-trifosfaadilt kas lipiidide, suhkrute või valkude hüdroksüülrühmadele (Joonis 1). Valkude fosforüülimine on üks post-translaatorseid modifikatsioone, mis suurendab proteoomi mitmekülgust ning on oluline valkude aktiivsuse reguleerimisel. Proteiinkinaasid katalüüsivad fosforüülrühma ülekannet substraatvalgu seriini, treoniini või türosiini jäägi hüdroksüülrühmale ning proteiinkinaase jaotatakse kolme gruppi vastavalt nende sihtmärkidele – türosiini-spetiifilised, seriini/treoniini-spetsiifilised ning mõlema, türosiini ja treoniini-spetsiifilised kinaasid [1]. Inimkinoomis leidub 538 proteiinkinaasi [2–4], millest enamik on seriini-treoniinikinaasid [2].



**Joonis 1.** Fosforüürühma ülekanne ATP-lt substraadile (R – substraat) [2]

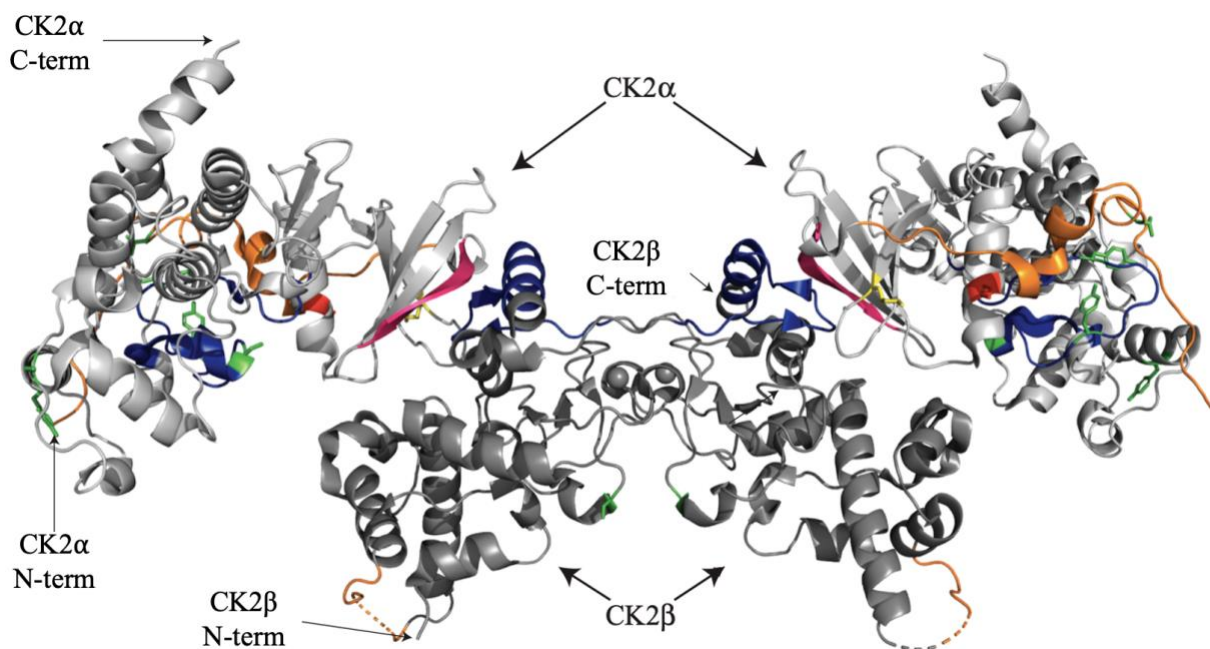
Valkude fosforüülimisega saab mõjutada nende aktiivsust kutsudes esile konformatsioonilise muutuse – valgud kas aktiveeruvad või inaktiveeruvad [5]. Seondunud fosforüülrühm suudab moodustada tugevaid vesiniksidemeid, mis võivad mõjutada sisemolekulaarseid või molekulidevahelisi interaktsioone [2]. Substraatvalgu aktiivsuse mõjutamise tulemusena kontrollivad proteiinkinaasid pea kõiki protsesse eukariootsetes rakkudes nagu metabolism, transkriptsioon, raku liikumine, apoptoos, raku paljunemine ja ellujäämine. Valkude fosforüülimine mängib kriitilist rolli rakkudevahelisel suhtlusel raku arengujärgus, füsioloogilistes vastetes, homöostaasis ning ka närvi- ja immuunsüsteemi funktsioneerimises [3].

Omades mitmeid tähtsaid rolle organismis, näiteks raku elusuutlikus ja paljunemine, on muteerunud liigaktiivseid või üleekspressioneeritud proteiinkinaase seostatud mitmete haigustega. Muteerunud kinaasid on sageli onkogeneesi alustajaks, kuid need omavad tähtsust ka põletikulistes haigustes, diabeedis, nakkushaigustes ning kardiovaskulaarsetes haigustes [2,4,6]. Fosforüülimistasakaalu probleemidest põhjustatud tagajärgede tõttu on see ensüümide perekond tõusnud tähtsaks ravimisihtmärgiks, millele kuni 33% ülemaailmsest

ravimiarendusest on tähelepanu suunanud [6]. Ravimina kasutusele võetud proteiinkinaaside inhibiitoreid on tänaseks üle 70 [7].

## 2.2. Proteiinkinaas CK2

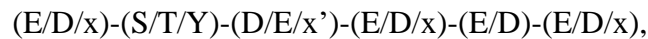
Proteiinkinaas CK2 (vananenud nimetusega kaseiinkinaas 2) (Joonis 2) on kõrgelt konserveerunud järjestusega seriini ja treoniini jääke fosforüüliv proteiinkinaas, mis mõningatel juhtudel suudab fosforüülda ka türosiini jääke. Fosforüülrühma doonoriks saab olla nii ATP kui ka GTP. CK2 võib esineda kas vaba katalüütilise alaühikuna või tetrameerse holoensüümina. Viimane koosneb kahest katalüütilisest alaühikust (CK2 $\alpha$  ja CK2 $\alpha'$ ) ning kahest regulaatorsest alaühikust (CK2 $\beta$ ). Katalüütilised alaühikud on kodeeritud kahe geeni poolt ning regulaatorne alaühik ühe geeni poolt. Regulaatorne alaühik mõjutab substraadi spetsiifilisust ning stabiliseerib katalüütilist alaühikut [8,9].



**Joonis 2.** CK2 holoensüüm [9]. Joonis esitatud muudetud kujul.

CK2 aktiivsust reguleeritakse mitmete bioloogiliste signaalradadade abil. Regulatsioon saab toimuda kinaasisiseselt ning -väliselt läbi post-translatoorsete modifikatsioonide, valkudevaheliste ning väiksemate biomolekulide interaktsioonide [9]. Kinaasi alaühikud võivad üksteist vastastikuselt reguleerida, nt. CK2 katalüütilise alaühiku CK2 $\alpha$  inhibeerimine vähendab CK2 $\beta$  ekspressiooni ja vastupidi [8,9]. Võrreldes teiste proteiinkinaasidega, on CK2 pidevalt aktiivne [10–12].

Proteiinkinaas CK2 on atsidofiilne kinaas, mis tunneb ära substraadid, millel on negatiivse laenguga aminohappejäägid. Ensüümi poolt äratuntav valksubstraadi konsensusjärjestus on:



kus E/D on glutamaadi või aspartaadi aminohappejääk, S/T/Y (vastav aminohappejääk seriin, treoniin või türosiin) on fosforüülrühma aktseptor, x ja x' on positiivse laenguta aminohappejääk, millest x' välistab proliini. Tähtsamad happelised aminohappejäägid on n+3 ning n+1 asendis, kus n on fosforüülitav aminohappejääk. Happelise aminohappejäägi puudumisel n+3 asendis leidub see n+1 asendis ning vastupidi. Asendite n-1 ja n+4 vahel asetsevad aluselised aminohappejäägid väga harva, sest positiivsed laengud nendel positsioonidel takistavad sidumist [13].

CK2 on pleiotroopne ehk kinaasil on palju fosforüülitavaid substraate, mida on avastatud üle 400 [8,10]. CK2 leidub nii rakutuumas, tsütoplasmas, mitokondris kui ka rakuvälises matriksis. Samuti on CK2 $\alpha$  ning CK2 $\beta$  levinud ajus ning endokriinses koes. CK2 substraadid saab jagada kolme klassi vastavalt sellele, milline molekulaarne CK2 vorm fosforüülimist katalüüsib. Esimest klassi substraate fosforüülib nii holoensüüm kui ka vabad CK2 katalüütilised alaühikud. Teist klassi substraate fosforüülivad ainult CK2 katalüütilised alaühikud ning kolmandat klassi substraate fosforüülib CK2 holoensüüm, sest on vajalik regulatoorse alaühiku ning substraadi interaktsioon. Ligi kolmandik CK2 substraatidest on seotud geeniekspressiooniga, valgusünteesiga, samuti on paljud substraadid tähtsad viiruse elutsükliks. CK2 on seotud pea kõikides raku võtmeprotsessides: kinaas suurendab raku kasvu ja paljunemist, muudab raku morfoloogiat ning kutsub esile angiogeneesi [8]. CK2 stabiliseerib kasvajaantigeeni p53, mis vastutab rakkude apoptoosi ja DNA paranduste eest. DNA kahjustuse korral p53 kas parandab või hävitab vigastatud raku [9].

Tuginedes CK2 pidevale aktiivsusele, tema olulisele rollile raku elutsükliks ja ellujäämises ning faktile, et vähirakud on justkui sõltuvuses CK2 aktiivsusest, on andnud perspektiivi, et ensüümi inhibeerimise tulemusena on võimalik haigusi kontrolli alla saada. CK2 inhibeerides pidurdub angiogenees ning kutsutakse esile rakusurm, mille tagajärjel väheneb vähirakkude levik [8,10,12]. Seega, CK2 inhibeerimine võib osutada edukaks variandiks takistamaks haiguste levikut.

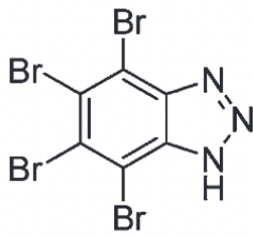
### 2.3. Proteiinkinaas CK2 inhibiitorid

Proteiinkinaas CK2 liigaktiivsuse pidurdamiseks on vaja leida ained ehk inhibiitorid, mis seda reguleerivad. Proteiinkinaasidel on kaks sidumispiirkonda, üks ATP jaoks ning teine valksubstraadi jaoks. Et inhibeerimine toimiks on tarvis takistada ensüümi tööd konkureerivate, ebakonkureerivate või mitte-konkureerivate inhibiitoritega.

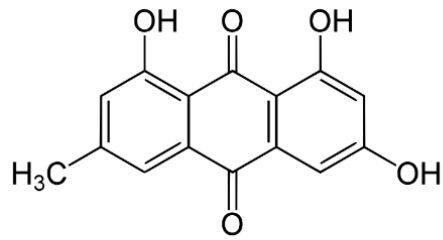
CK2 on organismis naturaalselt inhibeeritav. Kinaas on tundlik mitmetele post-translatoorsetele modifikatsioonidele, nt. CK2 aminohappejäägi S347 glükosüülimine, mis võib põhjustada kinaasi lagundamist proteasoomi poolt. Liigse fosforüülimise peatamiseks on tähtis roll ka CK2 interaktsioonil teiste valkudega. Ka väiksemad molekulid on inhibeeriva toimega. Negatiivselt laetud polüsahhariidi hepariini elektrostaatiline interaktsioon CK2-ga põhjustab inhibitsiooni [9].

Enamjaolt on uuritud ATP-konkurentseid inhibiitoreid. Mõningaid kuni nanomolaarse afiinsusega CK2 suhtes leiutatud inhibiitoreid (Joonis 3) on saatnud probleemid. Antrakinoonil emodin,  $K_i$  väärtusega  $1,90 \mu\text{M}$ , puudus spetsiifilisus. Polühalogeenitud heteroareenidest, nagu TBB ( $K_i = 0,04 \mu\text{M}$ ), võivad tekkida organismis toksilised metaboliidid. IQA, mis on selektiivne ning efektiivne CK2 inhibiitor, pole vesikeskkonnas piisavalt stabiilne, et kasutada seda ravimina [14].

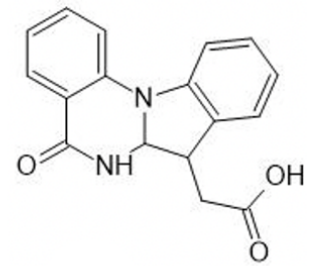
ATP-konkurentsete inhibiitorite kasutamine on raskendatud, sest ATP on proteiinkinaaside ühine substraat ja selle sidumistasku on kinaasidel sarnase ehitusega, mis muudab selektiivsuse saavutamise keerukaks. Proteiinkinaasid aga seovad erinevaid valke, mille analoogide välja töötamine võiks selektiivsust parandada, kuid sellisel lähenemisel lasub järgmine probleem – rakumembraaniläbitavus. ATP taskus on väikeste molekulide sidumisega võimalik saavutada lihtsamini suuremat sidumisvõimet, aga valksubstraadi sidumise piirkond on kinaasi pinnal, sellised inhibiitorid on suuremad hüdrofiilsemad struktuurid, mille korral on raskendatud raku plasmembraani läbimine. Ühtlasi CK2 on atsidoofiilne kinaas, mis tähendab, et kinaas seob negatiivselt laetud substraate. Valksubstraadiga konkureeriv CK2 inhibiitor peab seega olema negatiivselt laetud, kuid sellisel ühendil on raku sisenemine raskendatud [11].



TBB



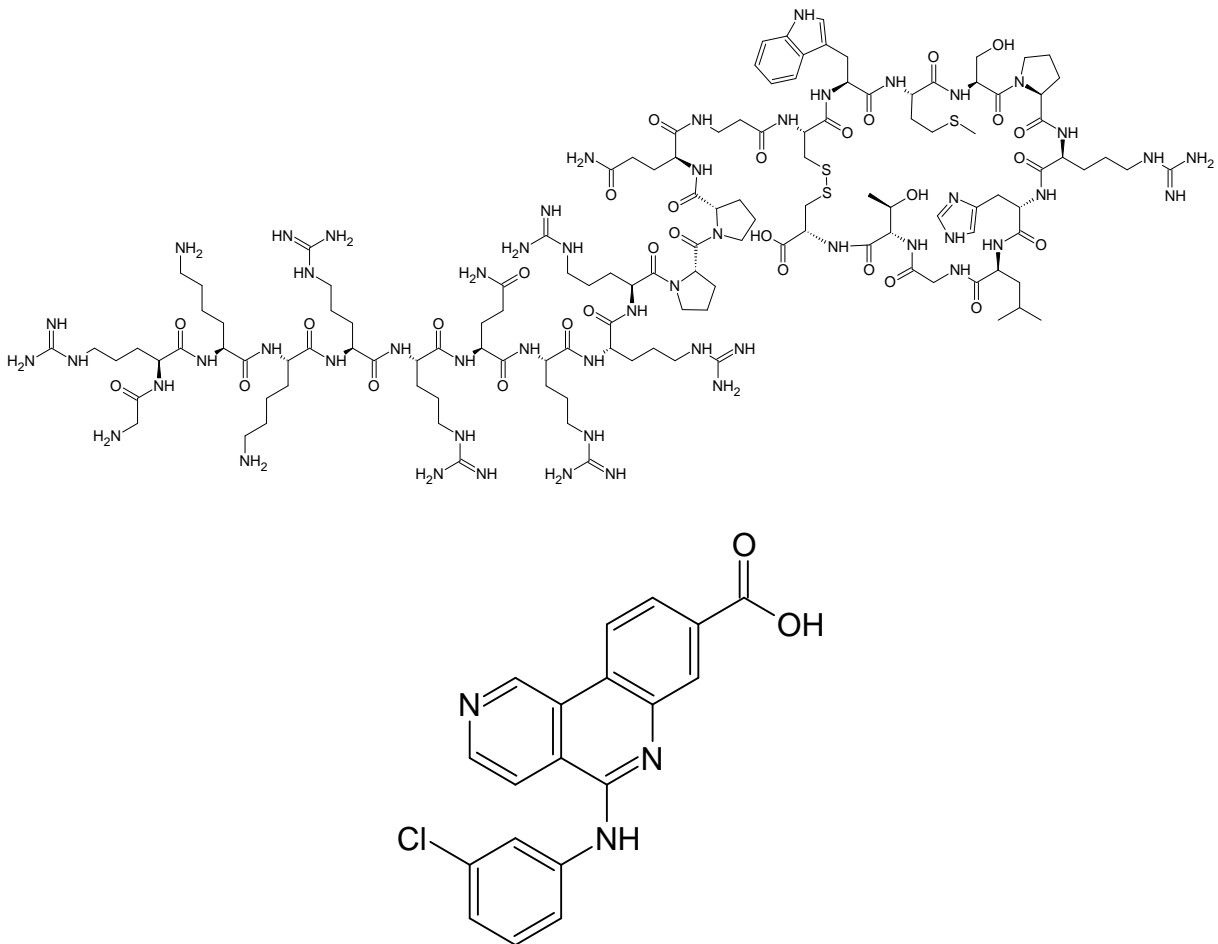
Emodin



IQA

### Joonis 3. Proteiinkinaas CK2 ATP konkurentsed inhibiitorid

Seniks on kliinilistesse katsetesse jõudnud kaks proteiinkinaas CK2-le suunatud inhibiitorit (Joonis 4), ATP-ga konkureeriv CX-4945 ning üks peptiidne valksubstraadi fosfoaktseptordomeenile seonduv inhibiitor CIGB-300 [9].



### Joonis 4. CIGB-300 (ülal) ning CX-4945 (all) struktuur

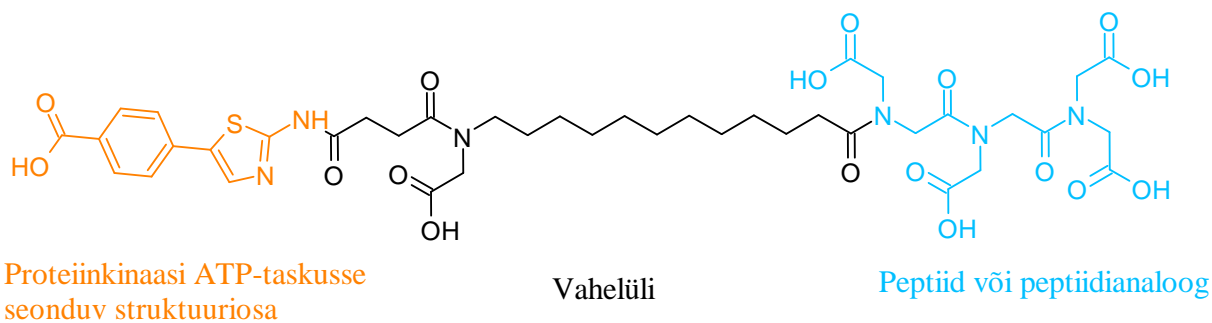
CK2-l on roll ka koroonaviiruse haiguses (COVID-19), mida põhjustab viirus SARS-CoV-2. CK2 ja teiste seotud kinaaside inhibeerimise tulemusena saavutasid Bouhaddou et al. [15] viirusvastase toime. Töödeldes SARS-CoV-2-ga nakatatud rakke CK2 inhibiitori CX-4945-ga,

väheneb märgatavalt viraalne sisaldus [9]. CK2 roll SARS-CoV-2 elutsüklis on piisavalt oluline, et CX-4945 on jõudnud kliinilistesse katsetesse, et olla potentsiaalne ravim koroonaviirusesse nakatunud keskmise kuni tõsiste haigusnähtudega patsientidele [16,17].

#### **2.4. ARC-tüüpi proteiinkinaas CK2 inhibiitorid**

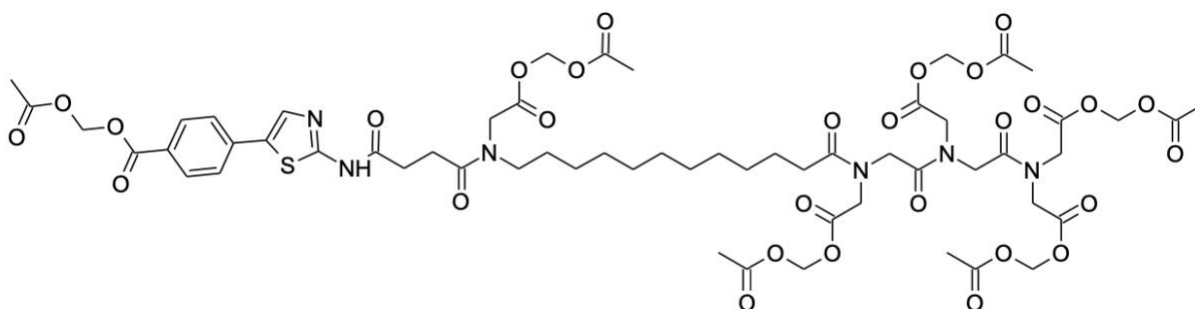
Omavahel ühendatud ATP ning konkreetse kinaasi substraati mimikeerivaid inhibiitoreid kutsutakse bisubstraatseteks inhibiitoriteks, millel on suurem selektiivsus ning sidumisvõime kui monosubstraatsetel inhibiitoritel. Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas töötatakse välja ARC-e (Joonis 5). CK2-le seonduvad ARC-id koosnevad nukleosiidi mimikeerivast fragmendist ning füsioloogilises keskkonnas negatiivselt laetud valksubstraati (peptiid või peptoid), mis mimikeerib CK2 konsensusjärjestust. Kahte fragmenti ühendab üheks vahelüli. ARC-d seonduvad korraka mõlema proteiinkinaasi substraadi sidumiskohta, mille tõttu on saavutatud pikomolaarses suurusjärgus afiinsused CK2 suhtes [11,18,19].

ARC-dele on võimalik kinnitada fluorestsentsvärv, mis võimaldab ühendit kasutada biosensorina. ARC-Fluo on ühendid, millel on fluorestsentsmärgis ning fluorestseeruvad olenemata, kas on kinaasiga seondunud või mitte. ARC-Fluo sonde saab kasutada FP mõõtmisel põhinevais sidumiskatsetes. ARC-Lum(Fluo) on ARC-Fluo, mille ATP-taskusse seonduv fragment sisaldab väävli või seleeni heterotsükli. Sellisel ARC-l on olemas nii fluorestsents (mille intensiivsus ei sõltu kinaasiga seondumisest, kuid FP sõltub) kui aeglaselt kustuv fotoluminestsents (mille intensiivsus sõltub kinaasiga seondumisest). ARC-Lum(Fluo) sonde saab kasutada nii aegviivitusega luminesentsi kui FP mõõtmistel põhinevais sidumiskatsetes. Klassikaliselt on inhibiitorite toimet ja kinaasi aktiivsust mõõdetud ensüümkatalüütilise reaktsiooni kineetikat uurides, kasutades substraadina ATP-d, millel on radioaktiivset fosforit sisaldav  $\gamma$ -fosforüülrühm. Viimase käsitlemine vajab spetsiaalseid ettevaatusabinõusid. Fluorestsentsi mõõtmisel põhinevad sidumiskatsed on kasutajasõbralikumad ja ohutumad [20,21].



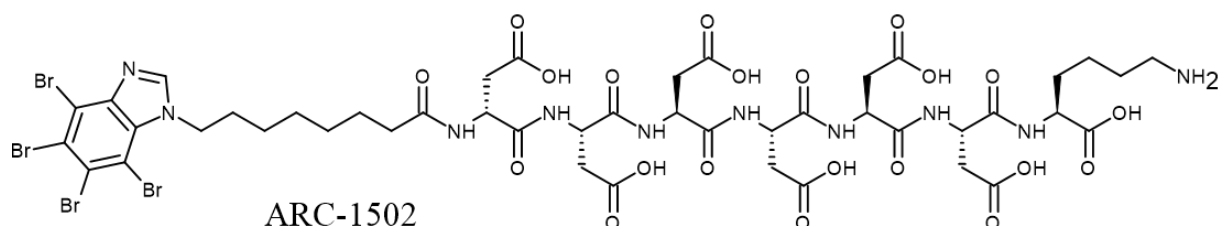
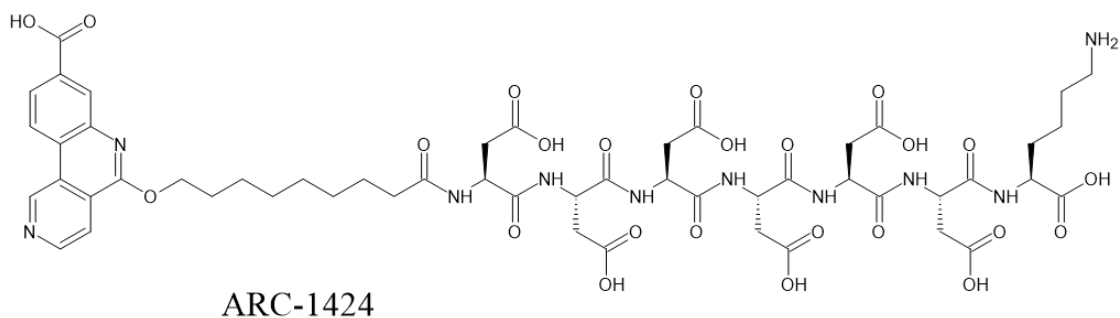
**Joonis 5.** Proteiinkinaasi CK2 bisubstraate inhibiitori ARC-772 struktuur

Negatiivse laenguga ARC-e on edukalt viidud läbi raku plasmamembraani, kui valksubstraati mimikeerivas ahelas kasutada peptiidi asemel peptoidi, mille karboksüülrühmad maskeeritakse atsetoksümetüülestrina (AM-ester) (Joonis 6). Selline muudatus aitab ajutiselt kaotada laengud, estrid hüdrolüüsitakse rakus esteraaside abil ning inhibiitor vabaneb aktiivsena. Proteolüütilise lagunemise vastu stabiilsuse suurendamiseks peab kasutama peptiidiosas D-aminohappeid või peptiidide asemel peptoidide [22].



**Joonis 6.** ARC-775 (ARC-772 hekso-AM-ester) struktuur

ARC-i ATP-taskusse seonduva fragmendina on kasutatud ka CX-4945 ning TBBi derivaate (ARC-1424 ning ARC-1502 (Joonis 7)), mis on osutunud tõhusateks ja selektiivseteks CK2 bisubstraatseteks inhibiitoriteks ( $K_d = 0,037$  nM ja 0,5 nM vastavalt).

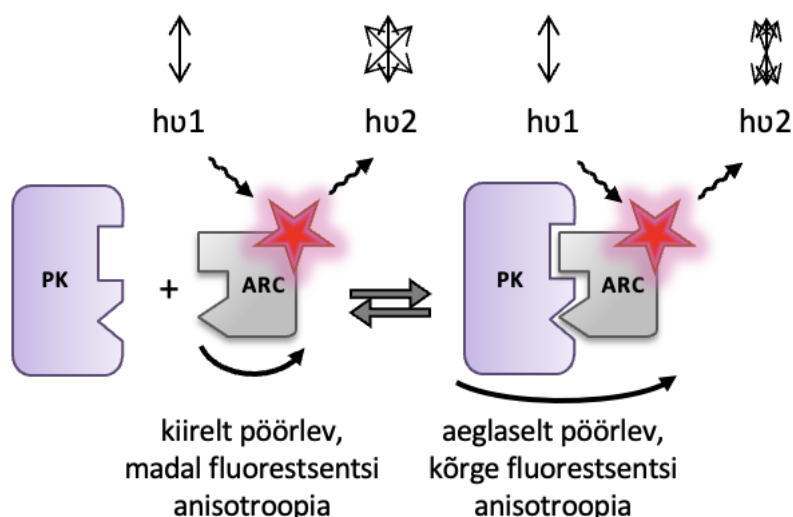


**Joonis 7.** ARC-1424 ning ARC-1502 struktuurid

## 2.4. Fluorestsentsi anisotroopia

Proteiinkinaasi inhibiitoreid saab iseloomustada mõõtes fluorestsentsi anisotroopiat, mille korral kiiritatakse proovi polariseeritud valgusega. Anisotroopia muutus on tingitud lahuse viskoossusest ning molekuli suuruselt. Madala viskoossusega lahuses pöörleb fluorofoor kiirelt, mis põhjustab depolariseeritud valguse emissiooni. Fluorofoori molekulid, mis on väikesed, pöörlevad lahuses kiiremini kui suuremad molekulid, nagu valgud [23].

Vaba ligand, millele on kinnitatud fluorestsentsmärgis, pöörleb lahuses valgule seondumata kiirelt. Pärast väikese lahuses vaba fluorofoori molekuli kiiritamist polariseeritud valgusega, on selle poolt emiteeritud valgus algse polarisatsioonitasandiga tugevalt depolariseeritud, sest algse polariseeritud footoni ning ergastatud footoni võnketasapinnad on kiire pöörlemise tõttu erinevad ning anisotroopia väärtus on selle tõttu madal. Valgud on võrreldes inhibiitoritega suuremad ning pöörlevad lahuses aeglasemini. Fluorofoor, mis on valgule seondunud, emiteerib pärast polariseeritud valgusega ergastamist vähem depolariseeritud valgust ning põhjustavad kõrge anisotroopia väärtuse (Joonis 8). Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmiste abil saab iseloomustada inhibiitorite seondumist proteiinkinaasidele [23].

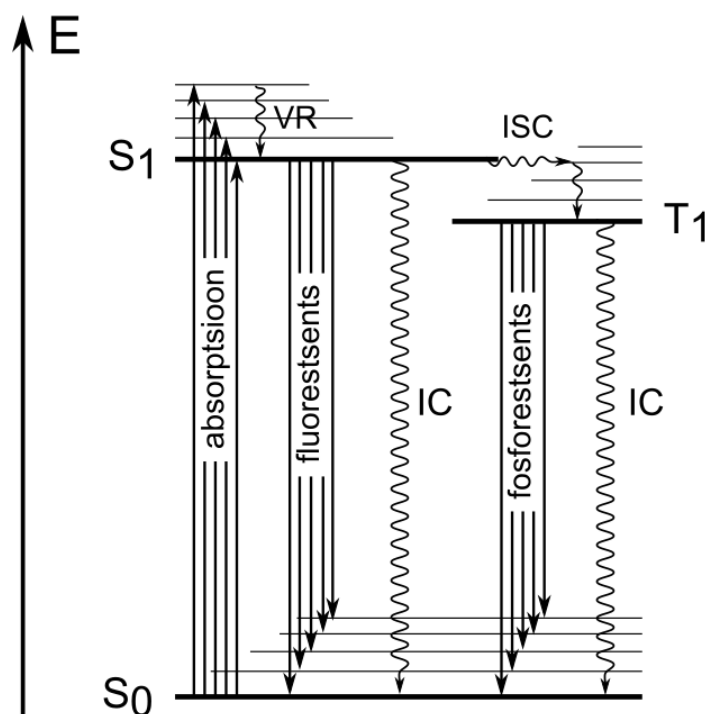


**Joonis 8.** Fluorestsentsi anisotroopiat seletav joonis

## 2.5. Fotoluminestsents

Elektromagnetkiirguse neelanud osake läheb ergastatud olekusse, mis on ebastabiilne ning naaseb põhiolekusse, mille käigus vabaneb neelatud energia kas valguse või soojuse näol. Valgusena vabanenud energiat nimetatakse fotoluminestsentsiks. Fotoluminestsents jaotub kahte liiki: fosforestsents ja fluorestsents. Valgusallikaks fosforestsentsi kui ka fluorestsentsi korral võib olla röntgenkiirgus, ultraviolettkiirgus, nähtav valgus või  $\gamma$ -kiirgus [24]. Erinevus kahe liigi vahel seisneb selles, et fluorestsentsi puhul ei toimu elektronide spinni muutumist [23]. Ergastus- ja emissioonilainepikkus on alati erinevad, sest esineb energiakadu, seega on emiteeritud valgus pikema lainepikkusega (Stokesi nihe). Protsessi saab kirjeldada Jablonski diagrammi abil (Joonis 9).

Põhiolekus ( $S_0$ ) ergastatakse molekul kõrgemale singletsele ergastatud energiatasemele ( $S_1, S_2$ ), mille järel toimub sisekonversioon  $S_n \rightarrow S_{n-1}$ . Fosforestsentsi korral toimub süsteemivaheline üleminek singletsest olekust tripletsesse olekusse  $S_{n-1} \rightarrow T_n$ , mille korral muutub ka elektroni spinn. Tripletses olekust saab tagasi minna singletsesse põhiolekusse, mille järel vabaneb energia soojusena või toimub valguse emissioon fosforestsentsi näol, mis kustub eksponentsiaalselt  $10^{-6}$  sekundi kuni ühe minuti jooksul [25].

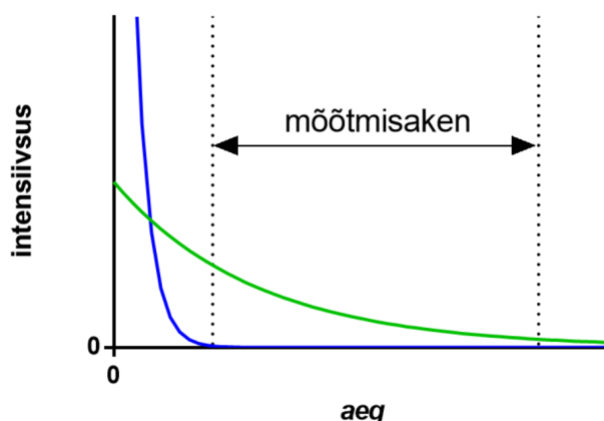


**Joonis 9.** Jablonski diagramm [23]. VR on vibratsiooniline relaksatsioon, ISC on süsteemivaheline üleminek, IC on sisekonversioon.

Fluorestsentsi korral on protsess sarnane, kuid puudub süsteemivaheline üleminek singletsest olekust tripletsesse olekusse. Pärast molekuli ergastumist kõrgemale singletsele energiatasemele, toimub sisekonversioon, millele järgneb vibratsiooniline relakseerumine madalaimale ergastatud energiatasemele ja seejärel fluorestsents, kui saavutatakse taas põhiolek. Fluorestsentsi puhul kustub valgus eksponentsiaalselt  $10^{-9}$ – $10^{-7}$  sekundi jooksul [25].

## 2.6. Aegviivitusega luminestsentsi mõõtmine

Aegviivitusega luminestsentsi (ingl. *time gated luminescence*, TGL) mõõtmist saab rakendada ühenditega, millel on pika elueaga luminestsentsi signaal. Meetodi korral kiiritatakse proovi välklambiga ning mõõtmist alustatakse teatud aja möödudes (Joonis 10). Selline lähenemine on vajalik, et vältida kiiremini kustuva taustfluorestsentsi mõõtmist, mis võib olla põhjustatud proovi, näiteks rakkude fluorestseerumisest, välklambi kustumise kiirusest ja teiste mõõtesüsteemi komponentide fluorestsentsist. Meetodi töötamiseks tuleb kasutada sonde, millel on luminestsentsi eluiga pikem, kui taustfluorestsentsil, mikro- või millisekundi skaalas [23].



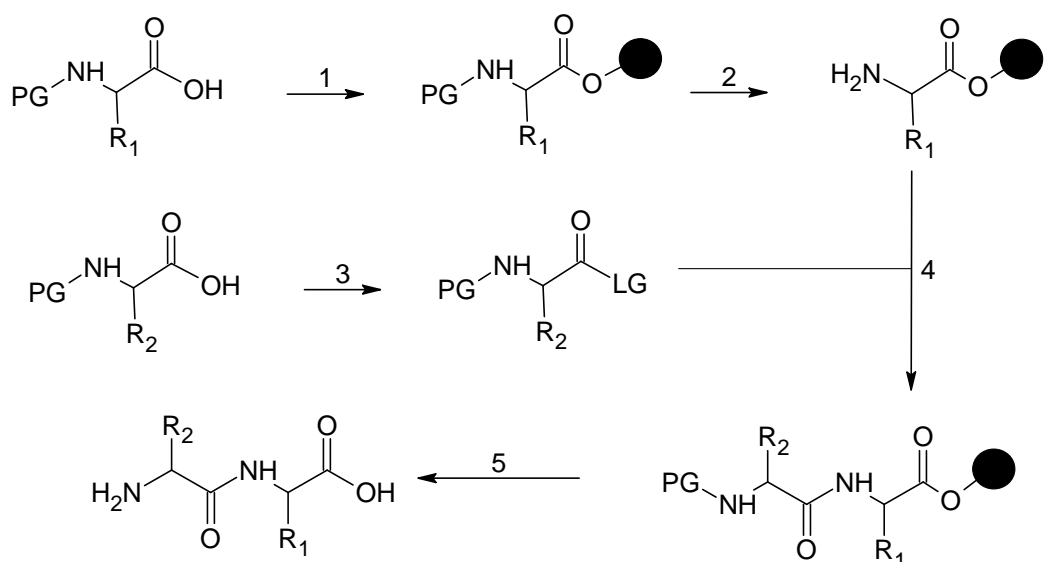
**Joonis 10.** Aegviivitusega luminesentsi mõõtmine. Sinine: tausta fluorestsents, roheline: aeglaselt kustuv fotoluminescents.

## 2.7. Tahkefaassüntees

Peptiide on võimalik sünteesida nii vedelas kui ka tahkel faasil ehk reaktsioonisegus lahustumatul polümeeril. Tahkefaassünteesistrateegia korral peptiidahela ülesehitamine algab C-terminaalsest otsast, mis on kinnitatud tahkele kandjale ehk vaigule (ingl k. *resin*). Vaik, mille külge peptiidijärjestust ehitatakse, on reaktsioonikeskkonas lahustumatu. Tahke kandja küljes on kindel arv funktsionaalrühmi, mille külge peptiidahel kinnitub. Funktsionaalrühmade moolide arvu tahke kandja massiühiku kohta nimetatakse mahtuvuseks (ingl k. *loading*) [26].

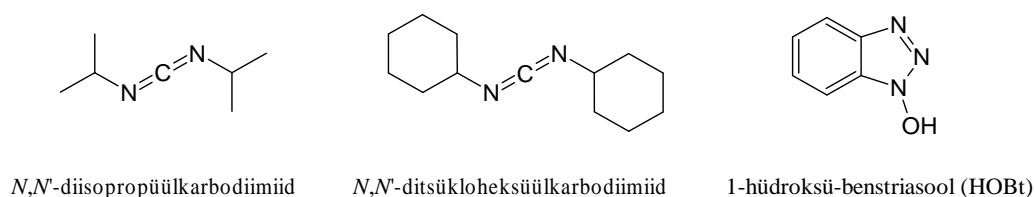
Tahkefaassünteesi eeliseks tavalise lahusefaassünteesi ees on kerge puhastamisvõimalus vaheetappides (filtreerimine), mistõttu saab kasutada reagentide suuri ülehulki, et kiirendada reaktsioone. Ühtlasi on tahke kandjaga seotud saaduste eraldamine reaktsioonikeskkonast lihtne ning meetodit on võimalik automatiseerida. Reagentide kulu tahkel faasil sünteesides on suurem, mis ühtlasi on selle meetodi üks puudustest. Reaktsioonikulgu on lahusefaasis võimalik mitmete erinevate meetoditega jälgida, üks lihtsamaid meetodeid on plaanarkromatograafiline analüüs (TLC). Tahkefaassünteesi puhul on meetodite valik piiratud, sest peptiidijärjestus on vaigu küljes kinni. Vaigu küljes oleva peptiidi analüüsimiseks saab mingi koguse ehitatud järjestusest vaigult maha kliivida ja seejärel teostada analüüs, kuid see on üldiselt töömahukas ja vähendab saagist. Funktsionaalrühmaseptsiifilised värvusreaktsioonid on peamised meetodid tahkefaassünteesi progressi jälgimisel [26].

Peptiidisüntees tahkel kandjal algab *N*-kaitstud aminohappe C-terminaalse otsa lisamisega vaigule (Skeem 1).



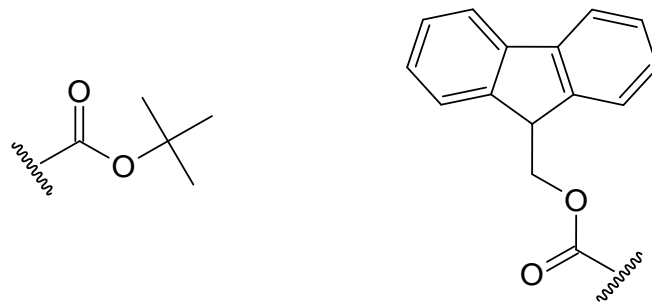
**Skeem 1.** Peptiidi süntees tahkel kandjal. 1) Aminohappe kinnitamine tahkele kandjale (tähistatud musta kuulikesega); 2) kaitserühma eemaldamine aminohappelt; 3) uue liidetava aminohappe karboksüülrühma aktiveerimine; 4) uue aminohappe liitumine; 5) peptiidijärjestuse eemaldamine tahkelt kandjalt. Etappe 2–4 korratakse kuni saadakse soovitud peptiidijärjestus. **PG** on kaitserühm, **LG** on lahkv rühm.

Seejärel eemaldatakse peptiidi N-terminaalne kaitserühm ning lisatakse järgmine aminohape, mille karboksüülrühm tuleb aktiveerida, sest peptiidsideme teke karboksüülhappe ja primaarse amiini vahel on kõrge aktivatsioonienegiaga. Aktiveerimiseks muundatakse karboksüülrühm tavaliselt kas aktiivestriks või anhüdriidiks. Aktivaatorid on üldiselt fosfooniumi, amiiniumi/urooniumi reagentid või karbodiimiidid (Joonis 11). Kui lisatav aminohape sisaldab reaktsioonivõimelist kõrvalrühma, tuleb see kaitsta ortogonaalselt, st kaitserühmad on eemaldatavad eri tingimustes [26].



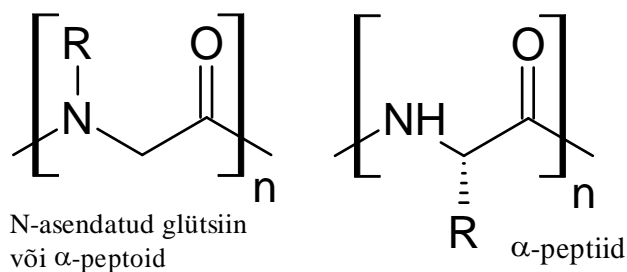
### Joonis 11. Karboksüülrühma aktivaatorid

Tüüpilised aminohapete  $\alpha$ -aminorühma kaitserühmad on Fmoc- ning Boc-rühm (Joonis 12). Fmoc on eemaldatav 20%-lise piperidiini lahusega DMF-s ning Boc rühm eemaldatav TFA-ga. Soovitud järjestuse omandamisel eemaldatakse vaigult järjestus ehk kliivitakse (ingl k. *cleavage*) [26].



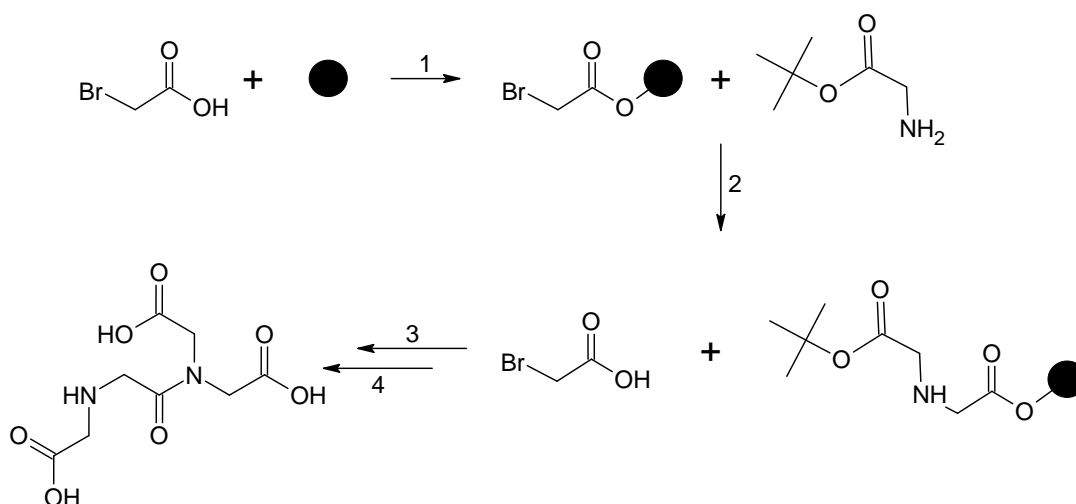
### Joonis 12. Boc ja Fmoc kaitserühm

Tahkefaassünteesi meetodiga saab sünteesida ka teisi peptiidilaadseid struktuure. Peptoidid on peptiidilaadsed struktuurid, mille korral polüamiidi külghelad ei paikne mitte  $\alpha$ -süsiniku, vaid  $\alpha$ -aminorühma küljes (Joonis 13).



### Joonis 13. Peptoidi ja peptiidi võrdlus

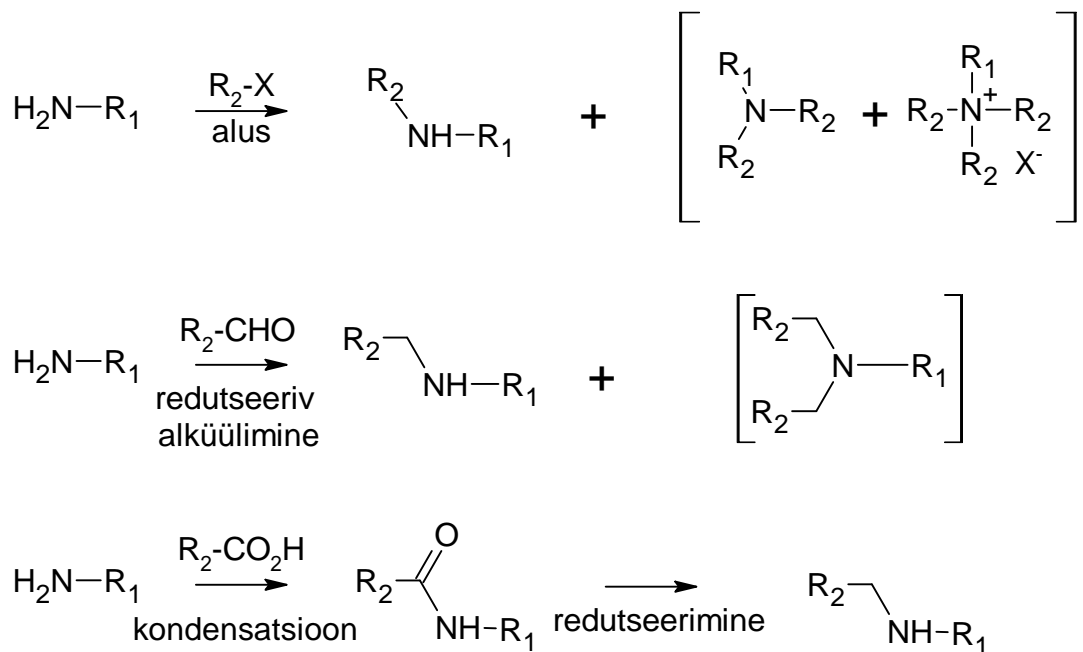
Üheks võimaluseks peptoidahela ehitamiseks on submonomeerne süntees, mille korral vahelduvad atsüülimise ning *N*-alküülimise etapid (Skeem 2). Sarnaselt peptidisünteesile algab C-terminaalse otsa kinnitamine tahkele kandjale, milleks kasutatakse haloädikhapet, millele järgneb *N*-alküülimine, kus lisatava *N*-asendatud ühendi aminorühm asendab haliidi ning moodustub peptoid. Sellele järgneb atsüülimine samuti haloädikhappega, mis aktiveeritakse karbodiimiidiga ning etappe korratakse kuni saavutatakse soovitud järjestus [27].



**Skeem 2.** Peptoidisüntees tahkel faasil. 1) Haloädikhappe (skeemil bromoädikhape) lisamine tahkele kandjale (tähistatud musta kuulikesena); 2) N-alküülimine, moodustub peptoid; 3) korratakse atsüülimist haloädikhappega ning N-alküülimist, kuni soovitud järjestus saadakse ning 4) eemaldatakse sünteesitud ühend vaigult.

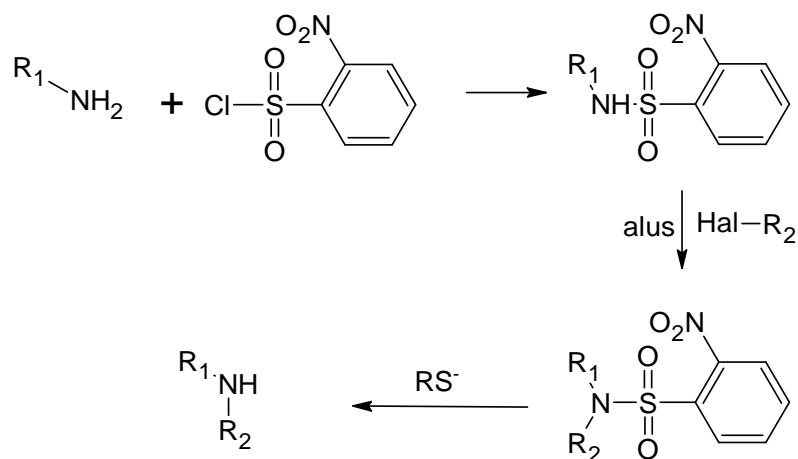
## 2.8. Sekundaarse amiini sünteesistrategiad

Meetodeid erinevate asendusrühmadega sekundaarsete amiinide sünteesimiseks on mitmeid (Joonis 14), kuid paljude meetodite puhul esineb soovimatuid kõrvalprodukte. Alküülhaliidi reageerimine primaarse amiiniga annab paralleelselt tertsiaarse amiini või kvaternaarse ammooniumsoola [28]. Tahkel faasil reaktsioon amiini ja üleliigse aldehüüdiga tekitab tertsiaarseid amiine, mis alandab saagiseid [29]. Eeldusel, et struktuuris ei esine muid tundlikke funktsionaalrühmi, saab amiine reageerima panna karboksüülhappega ja saadud amiid redutseerida amiiniks [28].



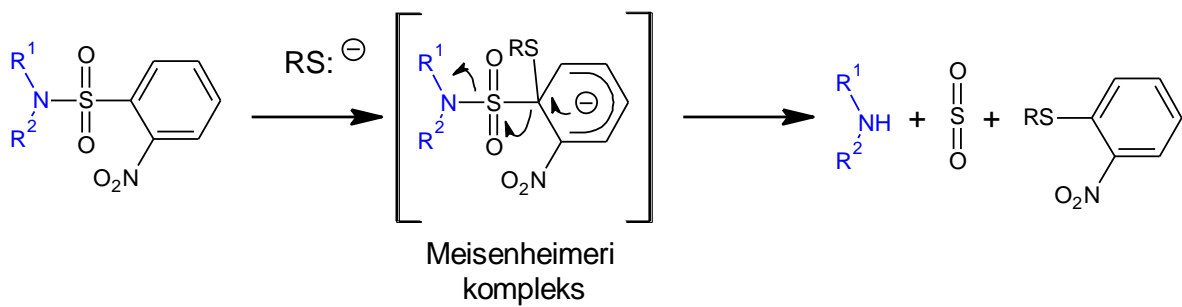
**Joonis 14.** Sekundaarse amiini sünteesistrateegiad

Üks edukas variant [28–31] on rakendada Fukuyama alküülimist, mille korral primaarne amiin konverteeritakse 2-nitrobenseensulfoonamiidiks (Ns) või 2,4-dinitrobenseensulfoonamiidiks (DNs). Fukuyama alküülimine toimub kolmes etapis (Skeem 3).



**Skeem 3.** Primaarse amiini konverteerimine sekundaarseks amiiniks Ns-strateegiaga

Primaarse amiini reaktsioonil NsCl-ga tekib 2-nitrobenseensulfoonamiid (Ns-amiid), mis on piisavalt happeline, et panna see reageerima alküülhaliidiga aluse juuresolekul, mille abil saab *N,N*-asendatud sulfoonamiidi edukalt ka tahkefaassünteesis [32]. Ns rühm eemaldub tioli abil, mis moodustab Meisenheimeri kompleksi (Joonis 15), millest vabaneb vaba sekundaarne amiin [28].



**Joonis 15.** Ns rühma eemaldamine [32]

Ns-kaitstud aminohapetelt kaitserühma eemaldamine 2-merkaptoetanooli abil eemaldatakse Ns-rühm ainult sellistel ühenditel, millel N-alküülimine on olnud edukas ning alküülimata variandilt Ns-rühm ei eemaldu [30]. Kui molekulis on korraga nii Ns ja DNs rühm, siis selektiivselt on võimalik DNs rühm eemaldada [28].

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1. Kasutatud kemikaalid

DMF, isopropanol, diklorometaan, dietüüleeter, metanool, trietüülsilaan, diisopropüületüülamiin, Tween 20 (P20), tionüülkloriid, tetrahüdrofuraan, 2-aminoetanool, 7-metüül-1,5,7-triasabitsüklo[4.4.0]deka-5-een, *p*-tolueensulfoonhappe monohüdraat, merkaptoetanool ja bromoetaanhappe *tert*-butüülester osteti firmast Sigma Aldrich. HBTU osteti firmast Iris Biotech GmbH. HOBt·H<sub>2</sub>O osteti firmast Novabiochem. 4-metüülmorfoliin, 1,8-diasabitsüklo[5.4.0]undeka-7-een ja püridiin osteti firmast Fluka. Trifluoroetaanhape, kloroform ja ditiotreitool osteti firmast Fischer Scientific. HEPES osteti firmast Calbiochem. Naatriumkloriid osteti firmast Riedel-de Haën. Etüülatsetaat osteti firmast Lach:ner. Trifenüülmetanool osteti firmast Fabrika Khimreaktivov g Lvov. Jodometaan ja nosüülkloriid (NsCl) osteti firmast Acros. HATU osteti firmas Anaspec. 5-klorometüültetrasool, bromoatsetamiid, 12-aminododekaanhape, bis-PEG5-hape (CAS 439114-13-3), oktadekaandihape ning 2-(*tert*-butüüldimetüülsilüüloksü)etaanamiin osteti firmast Fluorochem. MgSO<sub>4</sub> osteti firmast Mallinckrodt. Kõiki kemikaale kasutati täiendava puhastamiseta. *t*Bu-ATB sünteesisid samas laboris Eva Lea Jääger ja Kaido Viht. ARC-772 sünteesis varasemalt samas laboris Kaido Viht. Vaigu [Ida(*t*Bu)]<sub>3</sub>-2CTC sünteesis töö autor bakalaureusetöö raames. CX-4945 osteti firmast MedChemExpress.

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

#### 3.2. Kasutatud aparatuur

UV-Vis spektreid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Spektreid mõõdeti lahuses ruumalaga 1,5-2 µl optilise teepikkusega 0,1 cm. Inhibiitorite kontsentratsioonide arvutamiseks kasutati Lambert-Beerri seadust (Valem 1).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl, \quad (1),$$

kus  $A$  on lainepikkusel  $\lambda$  valguse absorptsioon lahusekihis paksusega  $l$ ,  $\varepsilon$  on neeldumiskoeffitsent (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) lainepikkusel  $\lambda$  ja  $c$  on aine kontsentratsioon. Töös kasutatud inhibiitorite neeldumiskoeffitsendid on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Kasutatud inhibiitorite neeldumiskoeffitsendid

| Ühendi kood       | $\varepsilon (\lambda_{max}) (M^{-1}cm^{-1})$ | $\lambda_{max} (nm)$ |
|-------------------|---|----------------------|
| ARC-809 – ARC-815 | 23 000  | 320                  |
| ARC-772           | 23 000  | 320                  |
| ARC-784           | 270 000                                       | 650                  |
| Ühend 6           | 9000  | 364                  |

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) analüüsiks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A. Pöördfaaskromatograafia teostati kolonniga Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250x4,6 mm), osakese suurusega 5 µm. Elueerimiseks kasutati MeCN/H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) gradienti voolukiirusega 1 ml/min. Kromatogrammid detekteeriti diodrivi UV-Vis absorptsioonidetektoriga SPD M20A. Massispektreid mõõdeti ESI mass-spektromeetriga Shimadzu LCMS-2020 positiivse ionisatsiooni režiimis.

Tuumamagnetresonantsspektrid (TMR) mõõdeti spektromeetriga Bruker Avance III HD. <sup>1</sup>H TMR mõõdeti sagedusel 700 MHz ning <sup>13</sup>C TMR spektrid mõõdeti sagedusel 176 MHz. Sisestandardina kasutati tetrametüülsilaani (TMS). Spektrite mõõtmiseks lahustati ained deutereeritud lahustis 0,5 ml ruumalas.

Luminesentsi mõõtmised mikroplaadil teostati mikroplaadilugejaga PHERAstar (BMG labtech). Lahused mõõdeti 20 µl lahuse ruumalas 384 süvendiga mittesiduva pinnaga mikroitiiterplaadil (Corning) 30 °C juures. Mikroplaadi inkubeerimiseks kasutati THERMOstar mikroplaadi inkubaatorit (BMG labtech). Andmetöötluseks kasutati tarkvara Graphpad Prism (versioon 6).

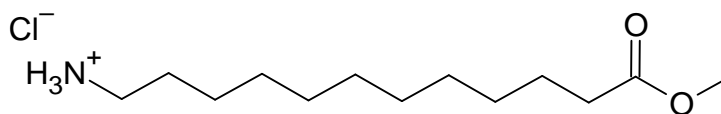
### 3.3. Sünteesieeskirjad

#### 3.3.1. 12-aminododekaanhappe metüülestri vesinikloriidhappe soola (1) süntees

Jäävannis 12-aminododekaanhappe (246 mg, 1,14 mmol, 1 ekv) lahusele metanoolis (2,5 ml, 65,54 ekv), lisati tilkhaaval SOCl<sub>2</sub> (202 µl, 3 ekv). Jäävann eemaldati ning reaktsioonisegu kuumutati üleöö 100 °C juures. Lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurustis. Saadust

analüüsiti TLC ( $R_f = 0,25$ ) abil, kus eluendina kasutati  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (10:1, v/v) segu, kuhu oli lisatud 3% TEA ning TLC plaat ilmutati metüülkollase lahusega. Saadi 12-aminododekaanhappe metüülestri vesinikloriidhappe sool (**1**) saagisega 97% (240 mg) (Joonis 16). Ühendi struktuur tõestati TMR abil.

**Ühend 1:**  $^1\text{H}$  TMR (700 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ )  $\delta$ : 8,01 (3H; s;  $\text{NH}_3^+$ ), 3,56 (3H; s;  $-\text{OMe}$ ), 2,69–2,75 (2H; m;  $\text{CH}_2$ ), 2,27 (2H; t;  $J = 7,4$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 1,46–1,57 (4H; m;  $(\text{CH}_2)_2$ ), 1,19–1,31 (14H; m;  $(\text{CH}_2)_7$ ).  $^{13}\text{C}$  TMR (176 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ )  $\delta$ : 173,8; 51,6; 40,4; 39,1; 33,7; 29,3; 29,2; 29,1; 29,0; 28,9; 27,3; 26,3; 24,9 (Lisa 1).

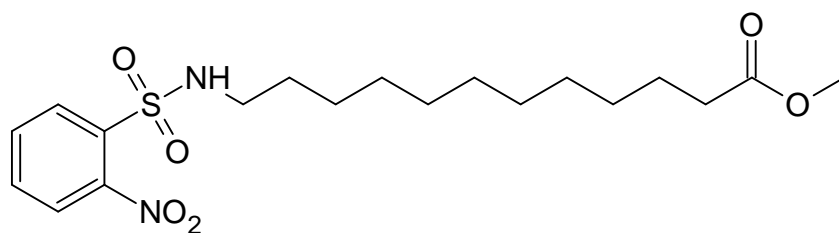


**Joonis 16.** 12-aminododekaanhappe metüülestri vesinikloriidhappe soola struktuur

### 3.3.2. 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe metüülestri (**2**) süntees

12-aminododekaanhappe metüülestri vesinikloriidhappe sool (**1**) (50 mg, 0,18 mmol, 1 ekv) lahustati THF-s (2 ml), kuhu lisati  $\text{NsCl}$  (52,94 mg, 1,27 ekv) ning TEA (84  $\mu\text{l}$ , 3,2 ekv) ning jäeti reageerima üleöö. Lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurustis ning saadud toorprodukt puhastati kolonnkromatograafia abil, kus esmalt kasutati eluendina  $\text{CHCl}_3$ , seejärel kasutati  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (20:1, v/v) segu. Kogutud fraktsioonidelt aurustati lenduvad komponendid ja saadi 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe metüülester (**2**) saagisega 95% (73,9 mg) (Joonis 17). Ühendi struktuur tõestati TMR abil.

**Ühend 2:**  $^1\text{H}$  TMR (700 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ )  $\delta$ : 8,12–8,15 (1H; m;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,84–7,88 (1H; m;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,72–7,76 (2H; m;  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 5,24 (1H; t;  $J = 5,8$  Hz; NH), 3,66 (3H; s;  $\text{OMe}$ ), 3,09 (2H; dt;  $J_1 = 5,8$  Hz,  $J_2 = 6,4$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 2,3 (2H; t;  $J = 7,52$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 1,61 (2H; m;  $\text{CH}_2$ ), 1,51 (2H; m;  $\text{CH}_2$ ), 1,16–1,32 (15H; m;  $(\text{CH}_2)_7$ ).  $^{13}\text{C}$  TMR (176 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ )  $\delta$ : 174,3; 148,1; 133,8; 133,5; 132,7; 131,1; 125,3; 51,4; 43,9; 34,1; 29,5; 29,39; 29,36; 29,35; 29,2; 29,1; 29,0; 26,4; 24,9 (Lisa 2).



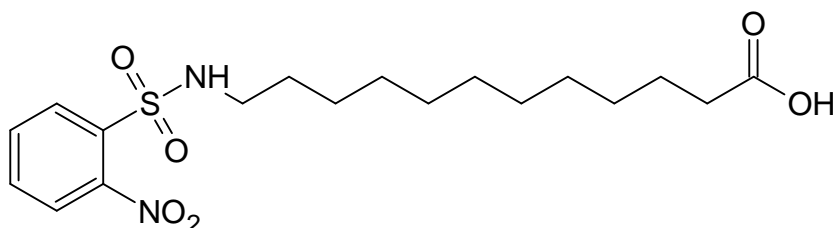
**Joonis 17.** 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe metüülesteri struktuur

### 3.3.3. 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe (Ns-aminododekaanhappe, **3**)

#### süntees

3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe metüülester (**2**) (74 mg, 0,18 mmol, 1 ekv) lahustati MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), kuhu lisati 1M LiOH (15 ekv) vesilahus (2,68 ml). Lahustuvuse parandamiseks lisati hiljem MeOH (2,5 ml) ning kuumutati reaktsioonisegu kuni lähteaine lahustus, mille järel lahus värvus kollakaks. Pärast 1 h analüüsi TLC-ga reaktsioonisegu, eluendina CHCl<sub>3</sub>/MeOH (20:1, v/v) segu. Selleks lisati reaktsioonisegust võetud proovile kahekordne ruumala 1M HCl lahust ning ilmutati metüülkollase lahusega TLC-plaati, mis tõestas metüülestri hüdrolyüüsi, sest plaadile tekkis roosa laik ( $R_f = 0,33$ ). Reaktsioonisegu hapestati 1M HCl (5,68 ml) lahusega ning vesilahust ekstraheeriti etüülatsetaadiga. Etüülatsetaadi kiht koguti, pesti küllastatud NaCl lahusega ning kuivatati veevaba MgSO<sub>4</sub> abil. Pärast kuivatamist eemaldati lenduvad komponendid rotaatoraurusti abil ja saadi 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe (**3**) saagisega 91% (65,4 mg) (Joonis 18). Saadust analüüsi TMR abil.

**Ühend 3:** <sup>1</sup>H TMR (700 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; Me<sub>4</sub>Si) δ: 11,94 (1H; s; COOH), 8,03 (1H; t; J = 5,7 Hz; NH), 7,97–8,00 (1H; m; H<sub>ar</sub>), 7,93–7,97 (1H; m; H<sub>ar</sub>), 7,83–7,87 (2H; m; H<sub>ar</sub>), 2,88 (2H; dt; J<sub>1</sub> = 5,7 Hz, J<sub>2</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>2</sub>), 2,18 (2H; t; J = 7,36 Hz; CH<sub>2</sub>), 1,47 (2H; m; CH<sub>2</sub>), 1,38 (2H; m; CH<sub>2</sub>), 1,10–1,27 (14H; m; (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>). <sup>13</sup>C TMR (176 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; Me<sub>4</sub>Si) δ: 174,9; 148,2; 134,3; 133,3; 133,0; 129,8; 124,7; 43,1; 34,1; 29,4; 29,33; 29,32; 29,31; 29,1; 29,0; 28,9; 26,3; 24,9 (Lisa 3).

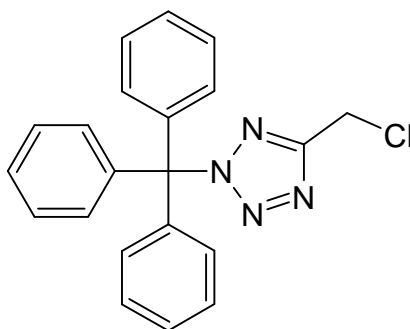


**Joonis 18.** 3-[(2-nitrobenseen-1-sulfonüül)amino]dodekaanhappe struktuur

### 3.3.4 5-klorometüül-2-trifenüülmetüül-2H-tetrasooli (ClCH<sub>2</sub>-tetrasool-Trt, **4**) süntees

5-klorometüültetrasooli (200 mg, 1,68 mmol, 1 ekv) lahusele benseenis (5 ml) lisati trifenüülmetanooli (485 mg, 1,1 ekv) ja *p*TsOH (26 mg, 0,05 ekv) lahus benseenis (2 ml). Reaktsioonisegu keedeti kolm tundi [33], mille järel lasti lahusel jahtuda ning moodustus valge sade. Sade filtreeriti, pesti dietüüleetri ja veega ning kuivatati õhu käes. Saadi 5-(klorometüül)-2-(trifenüülmetüül)-2H-tetrasool (**4**) saagisega 30% (184,7 mg) (Joonis 19). Saadus tõestati TMR abil, produktiks ühend **4**.

**Ühend 4:** <sup>1</sup>H TMR (700 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) δ: 7,31–7,38 (9H; m; H<sub>ar</sub>), 7,07–7,11 (6H; m; H<sub>ar</sub>), 4,80 (2H; s; CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C TMR (176 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) δ: 162,0; 141,0; 130,2; 128,5; 127,9; 83,6; 34,3 (Lisa 4).

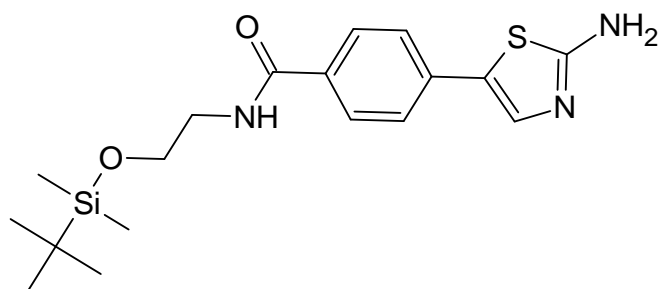


**Joonis 19.** 5-(klorometüül)-2-(trifenüülmetüül)-2H-tetrasooli struktuur

### 3.3.5. 4-(2-amino-1,3-tiasol-4-üül)-N-{2-[(*tert*-

### butüüldimetüülsilüül)oksü]etüül}bensamiidi (TBDMS-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ATB) (**5**) süntees

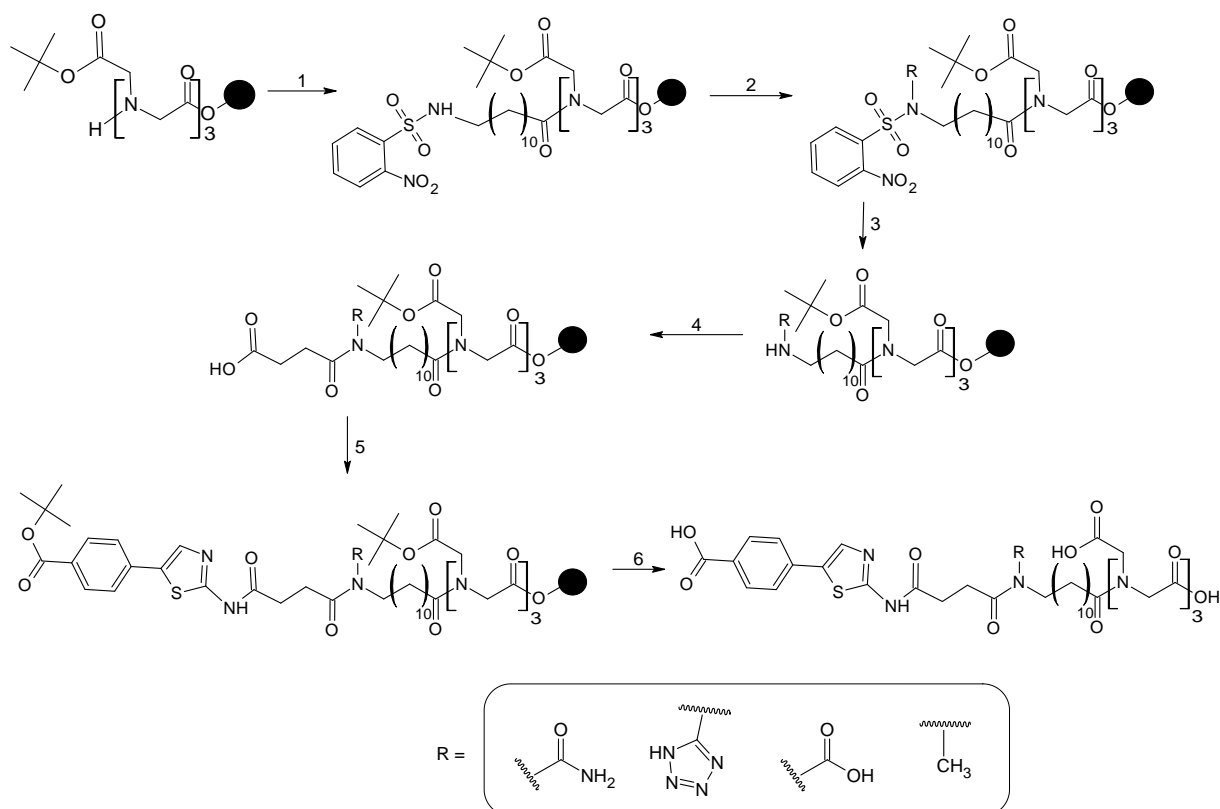
ARC-812 puhul modifitseeriti ATB-struktuuri eelnevalt lahusefaasis. Selleks eemaldati *t*Bu-ATB (3 mg, 0,011 mmol, 1 ekv) ühendilt *t*Bu-rühm 95% TFA/H<sub>2</sub>O lahusega (200 μl) 2 tunni jooksul, lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurusti abil. Seejärel lisati ATB lahusele DMF-is (2-aminoetoksü)(*tert*-butüül)dimetüülsilaani (4,78 mg, 5,6 μl, 3 ekv), HBTU (1 ekv) ja NMM (2 ekv) lahus DMF-s ning lasti reageerida ühe tunni toatemperatuuril. Lenduvad ühendid eemaldati vaakumis ning toorsaadus puhastati kolonnkromatograafiliselt, kasutades eluendina CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:1 v/v) lahust. Saaduseks ühend **5** (Joonis 20).



**Joonis 20.** TBDMS-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ATB struktuur

### 3.3.6. ARC-809 – ARC-812 süntees

Sünteesirada on esitatud skeemil 4. Kaaluti vajalik kogus vaiku (15 mg, 7.5 µmol), mille küljes oli [Ida(*t*Bu)]<sub>3</sub> (0,55 mmol/g). Vaigul lasti punduda DMF-is üks tund toatemperatuuril. Pundunud vaigule lisati ühend **3** (3 ekv), mille karboksüülrühm aktiveeriti kolm minutit segades kokku HOBt (3 ekv), HBTU (2,95 ekv) ja NMM (6 ekv) DMF-is ning lasti segul vaiguga reageerida üks tund (etapp 1). Vaik pesti viis korda DMF-i lahusega. Külghela liitmiseks dodekaanhappe aminorühmale kasutati lisatava külghela haliidderivaati (metüüljodiid, ühend **4**, bromoatsetamiid, bromoetaanhappe *tert*-butüülester; 4 ekv) MTBD (3 ekv) juuresolekul lahust DMF-is, mis reageeris üleöö toatemperatuuril (etapp 2). Seejärel pesti vaiku viis korda DMF-i lahusega ning eemaldati Ns-rühm töödeldes vaiku merkptoetanooli (10 ekv) ja DBU (5 ekv) DMF lahusega kaks korda 30 minutit (etapp 3). Ns-rühma eemaldumisele viitas lahuse värvumine kollaseks. Järgnes vaigu pesemine DMF-i lahusega viis korda. Vaigule lisati seejärel suktsiinhappe anhüdriid (5 ekv) koos püridiiniga (10 ekv) DMF-is, mille reaktsioon kestis 2 h (etapp 4). Vaik pesti viis korda DMF-i lahusega. *t*Bu-ATB lisamiseks aktiveeriti lisatud karboksüülhappe teine karboksüülrühm HOBt (3 ekv), HBTU (2,95 ekv) ning NMM-ga (6 ekv) DMF-i lahuses. Karboksüülrühmal lasti 10 minutit aktiveeruda, millele järgnes üks pesu DMF-i lahusega ning lisati *t*Bu-ATB (ARC-812 puhul ühend **5**) (2 ekv) ning DIPEA (5 ekv) lahus DMF-is ja jäeti reageerima üleöö (etapp 5). Järgnes vaigu pesu DMF-i lahusega kaks korda, üks kord *i*PrOH lahusega ning kaks korda DCM-i lahusega. Sünteesitud ARC eemaldati vaigult TFA:TES:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5 v:v:v) lahusega 2 tunni jooksul ning pesti ühe korra TFA-ga (etapp 6). Lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurustis ning koos-roteeriti väikese koguse veega, et TFA täielikult eemaldada. ARC-e analüüsiti HPLC-MS-iga ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt. Analüüsigradiendiks MeCN/0,1% TFA 20-80%/20 min (Lisa 5–8) ning puhastusgradiendid optimeeriti iga ühendi jaoks.

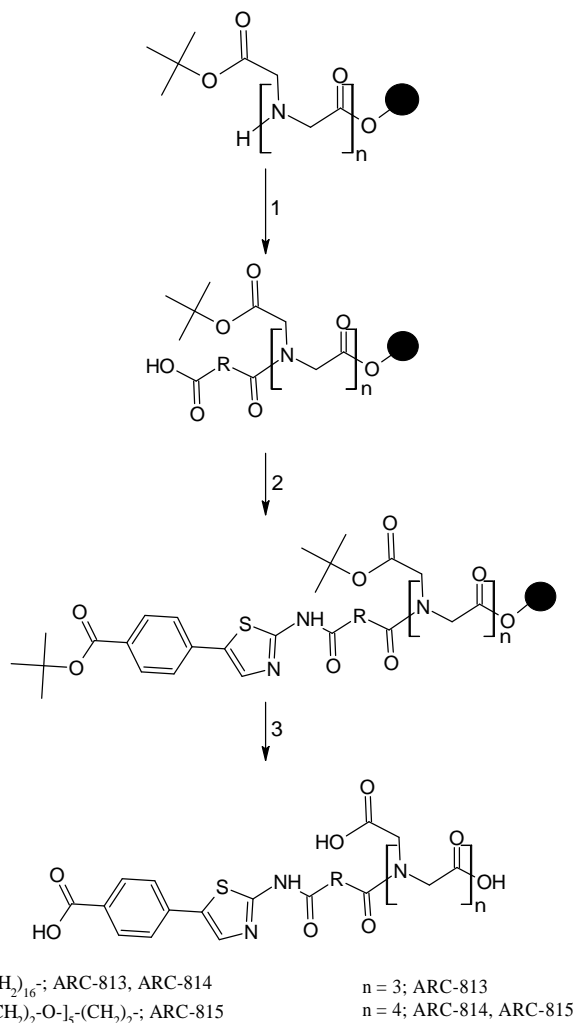


**Skeem 4.** ARC-772, ARC-809 – ARC-812 sünteesiskeem. 1) [Ida(*t*Bu)]<sub>3</sub>-2CTC vaigule Ns-aminododekaanhape kinnitamine; 2) ARC-809 puhul lisati bromoatsetamiid (R = CH<sub>2</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>), ARC-810 puhul lisati ClCH<sub>2</sub>-tetrasool-Trt(R = -CH<sub>2</sub>-tetrasool-Trt), ARC-811 puhul lisati CH<sub>3</sub>I (R = CH<sub>3</sub>), ARC-772 ning ARC-812 lisati Br-CH<sub>2</sub>COO*t*Bu (R = -CH<sub>2</sub>COO*t*Bu) , 3) Ns-rühma eemaldamine vaigult; 4) suktsiinhappe anhüdriidi lisamine; 5) ARC-772, ARC-809 – ARC-811 puhul *t*Bu-ATB lisamine, ARC-812 puhul TBDMS-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ATB; 6) sünteesitud ühendite eemaldamine vaigult.

### 3.3.7. ARC-813 – ARC-815 süntees

Sünteesimeetod on illustreeritud skeemil 5. Kaaluti vajalik kogus vaiku (15 mg, 7.5 µmol), mille küljes oli [Ida(*t*Bu)]<sub>n</sub>. Vaigul lasti punduda DMF-is ühe tunni toatemperatuuril. Pundunud vaigule lisati dikarboksüülhape (10 ekv), mille karboksüülrühm aktiveeriti eelnevalt kolm minutit HOBt (3 ekv), HBTU (3 ekv) ja NMM (20 ekv) lahusega DMF-is, seejärel lisati segu vaigule ja lasti reageerida 1 h, millele järgnes pesu ühe korra DMF-i lahusega (etapp 1). Seejärel aktiveeriti vaigule kinnitunud dikarboksüülhappe teine karboksüülrühm sama koostisega aktiveerimisseguga 10 minutit, millele järgnes pesu ühe korra DMF-iga ning lisati vaigu. Vaigule lisati *t*Bu-ATB (2 ekv) ning DIPEA (5 ekv) DMF lahus ja jäeti reageerima üleöö

toatemperatuuril (etapp 2). Järgnes pesu kaks korda DMF-iga, üks kord *i*PrOH-i lahusega ning kaks korda DCM-i lahusega. Sünteesitud ARC eemaldati vaigult TFA:TES:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5 ruumala järgi) lahusega ning vaiku pesti ühe korra TFA-ga. Lenduvad komponendid eemaldati rotaatoraurustis ning koos-roteeriti väikese koguse veega, et TFA täielikult eemaldada. ARC-e analüüsiti HPLC-MS-iga (Lisad 9–11) ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt C<sub>18</sub> kolonnis. Analüüsigradiendiks MeCN/0,1% TFA 20-80%/20 min ning puhastusgradiendid varieerusid ARC-de vahel.

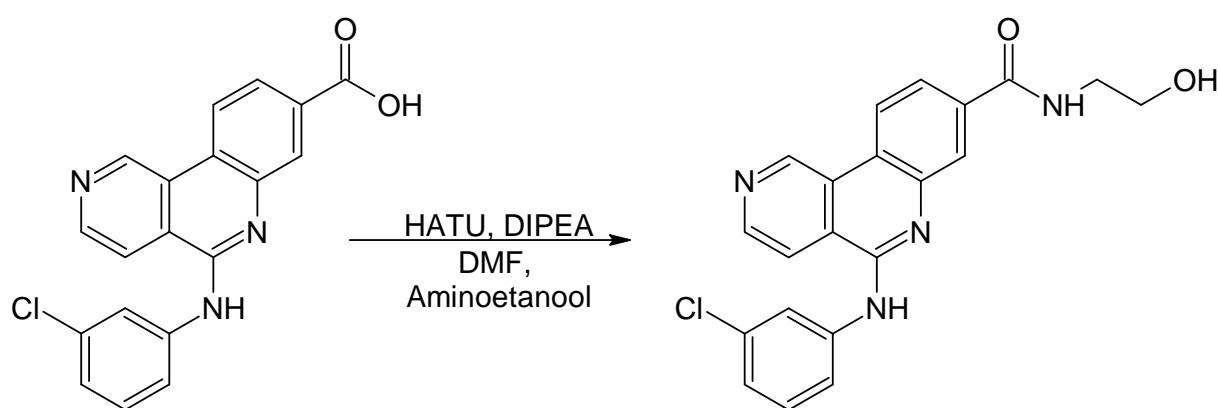


**Skeem 5.** ARC-813 – ARC-815 sünteesiskeem. 1) [Ida(*t*Bu)]<sub>3</sub>-2CTC vaigule dikarboksüülhappe kinnitamine; 2) kinnitatud dikarboksüülhappe teise karboksüülrühma aktiveerimine ning *t*Bu-ATB lisamine; 3) sünteesitud ühendite eemaldamine vaigult.

### 3.3.8. 5-(3-kloroanilino)-N-(2-hüdroksüetüül)benso[c][2,6]naftüridiin-8-karboksamiidi

#### (6) süntees

Lähtudes originaaleeskirjast [34], CX-4945 lahusele DMF-is (1 mg, 0,003 mmol, 1 ekv) lisati HATU (1,2 ekv.), mida segati toatemperatuuril 10 minutit. Seejärel lisati DIPEA (1 µl, 2 ekv), segati 10 minutit toatemperatuuril, mille järel lisati reaktsioonisegusse aminoetanool (1,72 µl, 10 ekv) ning jäeti üheks tunniks reageerima. Pärast ühte tundi eemaldati lenduvad komponendid lüofilisaatori abil (Skeem 6). Toorsaadus analüüsiti HPLC-MS-iga (Lisa 12) ning puhastati pöördfaaskromatograafiliselt C18 kolonniga, kus kasutati samu eluente, mida ka eelnevate ARC-ide analüüsimiseks.



Skeem 6. CX-4945 modifitseerimine [34]

### 3.4. Aktiivse proteiinkinaasi CK2 kontsentratsiooni määramine

Valmistati CK2α kahekordsete lahjenduste seeria alates kinaasi nominaalkontsentratsioonist 125 nM. Lisati fluorestsentssond ARC-784 lõppkontsentratsioonini 10 nM ( $K_d = 21$  pM), ARC-784 lahuse kontsentratsioon mõõdeti eelnevalt UV-Vis spektromeetriga ( $\epsilon = 270\,000$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (650nm)). Lahused valmistati 384 süvendiga mikrotiiterplaadile lõppruumalaga 20 µl. Enne mõõtmist inkubeeriti lahuseid 15 min 30 °C juures. Lahuste FP ja TGL signaale mõõdeti 30 °C juures optiliste moodulitega vastavalt [EX 590(50), EM 675(50)] ja [EX 337(50), EM 675(50)]. TGL signaali koguti ajavahemikus 60–260 µs pärast ergastamist. Detektor häälestati 10 nM ARC-784 lahusega, milles puudus kinaas. Aktiivse kinaasi kontsentratsioon arvutati valemiga 2:

$$A = (1 - X_1) \times A_f + X_1 \times A_b, \text{ kus} \quad (2)$$

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

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

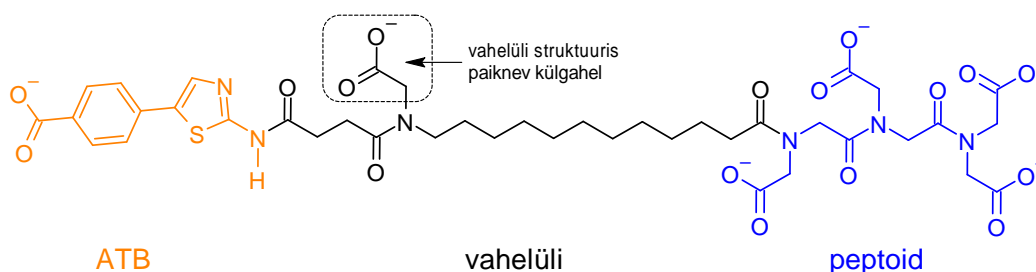
$A$  on mõõdetud anisotroopia,  $A_f$  on kinaasiga mitteseondunud ARC-784 anisotroopia väärtus,  $A_b$  on ARC-784 ja kinaasi kompleksi anisotroopia väärtus,  $L_t$  on ARC-784 kontsentratsioon,  $E_0$  on kinaasi nominaalkontsentratsioon,  $k$  on aktiivse kinaasi fraktsioon kinaasilahuses (aktiivse kinaasi kontsentratsioon/nominaalse kinaasi kontsentratsioon),  $K_d$  on ARC-784 ja CK2 $\alpha$  kompleksi dissotsiatsioonikonstant ning  $Q$  on seotud ja vaba ARC-784 fluorestsentsi intensiivsuste jagatis. Mõõdetud tulemustest koostati kõver (Lisa 13), telgedel anisotroopia ning kinaasi kontsentratsioon ning arvutati aktiivse kinaasi kontsentratsioon.

### 3.5. Ühendite proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine

ARC-tüüpi inhibiitorite seondumist proteiinkinaasile iseloomustati konkureeriva seondumise katses. Eksperimendid teostati kahes paralleelis. Inhibiitorite kontsentratsioonid mõõdeti enne katsete teostamist UV-Vis spektromeetriga. Kõikide lahjenduste tegemisel kasutati neljakomponentset puhvrit ning lahuste lõppruumala mikrotiiterplaadil oli 20  $\mu$ l. ARC-809 – ARC-815 ning ühendist **6** tehti kolmekordsed lahjendused kõrgeima kontsentratsiooniga 10  $\mu$ M, millele lisati CK2 $\alpha$  ja fluorestsentssondi (ARC-784) kompleks, kus aktiivse kinaasi ja fluorestsentssondi lõppkontsentratsioonid olid vastavalt 0,75 nM ja 10 nM. Võrdlusinhibiitorina kasutati ARC-772 ( $K_d$  (CK2:ARC) = 0,3 nM). Enne mõõtmisi inkubeeriti lahuseid 30 °C juures ja mõõdeti 15 min ja 30 min järel, et kinnitada, et sidumine on jõudnud tasakaalu 15 minuti järel. Mõõtmiseks kasutati samu optilisi mooduleid, mida ka aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramisel. Sidumiste analüüsimiseks kasutati matemaatilist mudelit, mille valem on leitav artiklis [35] tähistusega valem (3).

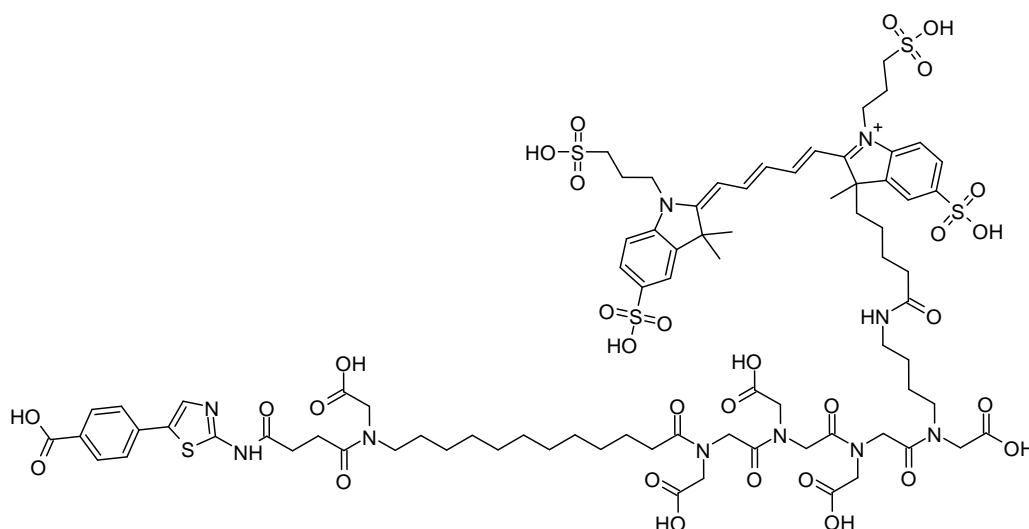
#### 4. Tulemuste arutelu

Tartu Ülikooli meditsiinilise keemia uurimisrühmas on varasemalt sünteesitud proteiinkinaasi CK2 bisubstraatseid inhibiitoreid, mille ATP-taskusse seonduvaks struktuuriosaks on tiasooli või selenasooli heterotsükkel ning CK2 substraadi sidumispiirkonnaga seonduvaks osaks on mitmeid karboksüülhappejääke sisaldav füsioloogilise pH juures negatiivse laenguga peptiid või peptoid [35–37]. Viimast tüüpi ühendite näiteks on ARC-772 (Joonis 21) [11], mis koosneb kolmest osast: negatiivselt laetud peptoidahelast, vahelulist ning ATB-jäägist. Vahelüli koosneb omakorda kolmest osast: suktsiinhappejäägist, aminododekaanhappejäägist ning nende kahe ühendamisel tekkiva amiidsideme lämmastiku küljes paiknevast külghelast, milleks on 2 süsiniku kaudu ühendatud etaanhape.



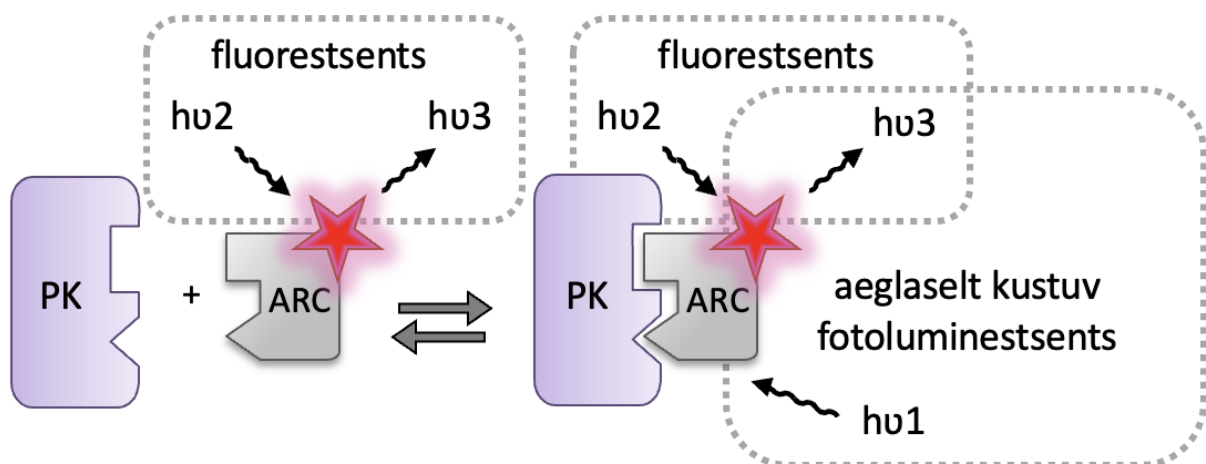
**Joonis 21.** ARC-772 struktuur

ARC-772  $K_d$  CK2-le sidumisel on 30 pM ning ühendit on võimalik per-atsetoksümetüülestrina raku viia [11,22]. ARC-772 fluorestsentsmürgistatud derivaadid nagu ARC-784 (Joonis 22) on ARC-Lum(Fluo) sondid – ühendid, mille CK2 kompleks, kuid mitte vaba fluorestsentsligand, emiteerib aeglaselt kustuvat fotoluminenstsentskiirgust [38].



**Joonis 22.** ARC-784 struktuur

ARC-Lum(Fluo) sonde saab kasutada inhibiitorite sidumise iseloomustamiseks proteiinkinaasidele. Proteiinkinaasid pole püsivad molekulid ning kaotavad aktiivsust üle aja. Kuna fluorestsentsmärgisega ühend seondub ainult aktiivsele proteiinkinaasile, saab kasutada ARC-Lum(Fluo) sonde aktiivse proteiinkinaasi kontsentratsiooni määramiseks konstrueerides sidumiskõvera, mille telgedel on fluorestsentsi anisotroopia või aeglaselt kustuva luminesentsi intensiivsuse muutus ning kinaasi kontsentratsioon. Fluorestsentspolarisatsiooni mõõtmiste korral lahuses vaba ARC-Lum(Fluo) sond emiteerib tugevalt depolariseeritud valgust ning anisotroopia väärtus on madal. Kinaasile seondunud sond emiteerib vähem depolariseeritud valgust, sest kinaasi-ARC-Lum(Fluo) kompleksi kui suure osakese pöörlemine on aeglane, mille tõttu on fluorestsentsi anisotroopia väärtus kõrge. Aeglaselt kustuva fotoluminesentsi mõõtmiste korral ARC-Lum(Fluo) emiteerib aeglaselt kustuvat luminesentsi kinaasi kompleksis ning mõõdetakse kiirguse intensiivsust pärast viivitusaja lõppu (Joonis 23).

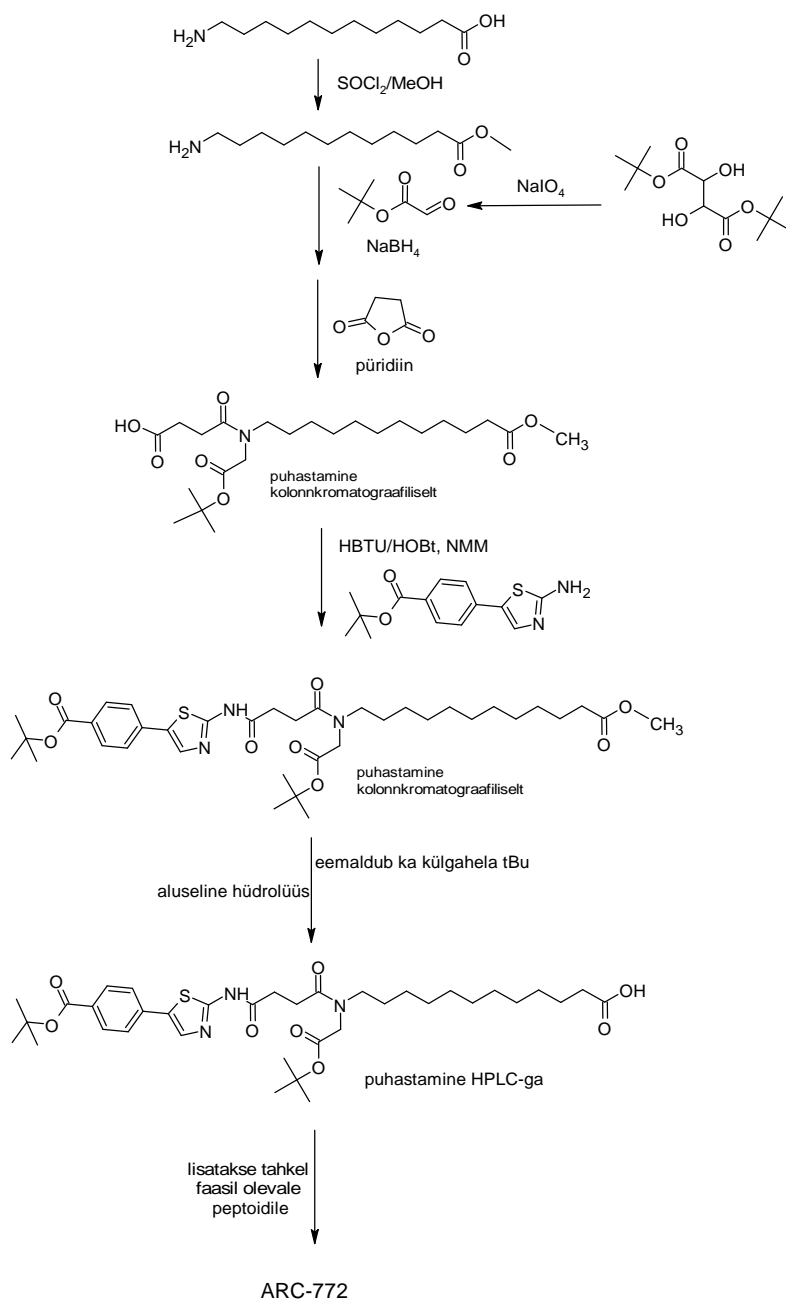


**Joonis 23.** Kinaasile seondunud ARC-Lum(Fluo) sond emiteerib aeglaselt kustuvat fotoluminesentsi

Konkureeriva sidumise katsetes uuritakse märgistamata inhibiitorit, mis lisatakse ARC-Lum(Fluo):kinaasi kompleksile. Märgistamata inhibiitor konkureerib fluorestseeruva sondiga ning tõrjub selle kompleksist välja, mille tõttu saabub olukord, kus lahusest mõõdetud fotoluminesentsi signaal vastab vabale ARC-Lum(Fluo)-le.

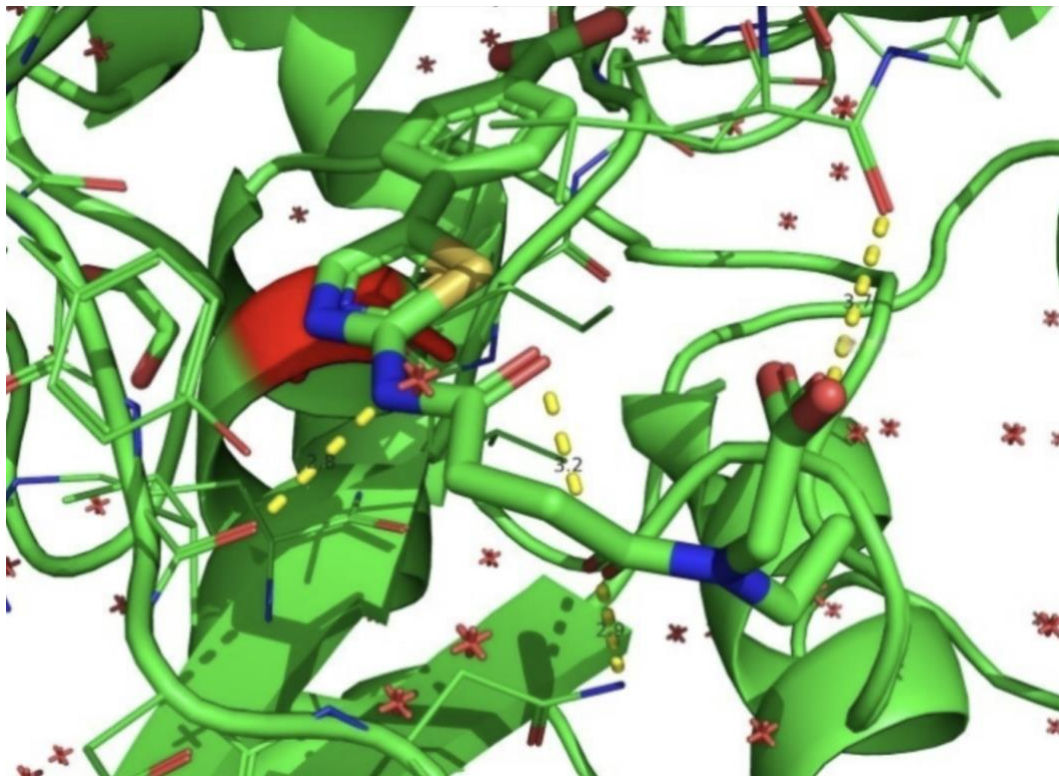
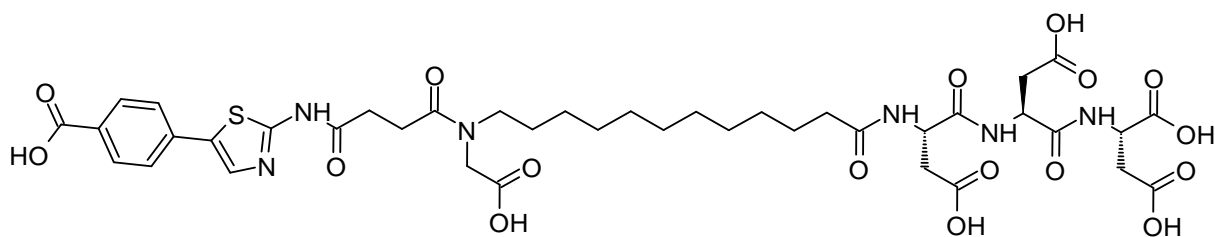
ARC-772 süntees on siiani olnud töömahukas (Skeem 7). Vahelüli ning ATP-taskusse seonduv fragment (*t*Bu-ATB-Suc-N(CH<sub>2</sub>COO*t*Bu)-Dda-OH) sünteesiti lahusefaasis, kus esines mitu etappi, mille järel lõppsaadust puhastati kromatograafiliselt. Enne tahkele faasile liitmist hüdrolüüsiti metüülester, mille käigus hüdrolüüsus osaliselt ka külghelas olev *t*Bu-ester,

seetõttu puhastati selle etapi saadus HPLC-ga. Viimaks amideeriti saadud *t*Bu-ATB-Suc-N(CH<sub>2</sub>COO*t*Bu)-Dda-OH lahustumatu polümeeri küljes olevale peptoidahelale.



**Skeem 7.** Varasem ARC-772 sünteesiskeem. Sama uurimisrühma avaldamata andmed.

ARC-772 puhul pole teada, kas vahelüli külghela struktuuris peab olema negatiivselt laetud külghel, kuna see struktuuriosa optimeeriti väiksema molekulmassiga ühendite jaoks [11]. ARC-772-sarnase struktuuri ARC-780 CK2-kompleksi röntgenkristallograafiline uuring näitas (Joonis 24), et inhibiitori vahelüli paiknev karboksüülrühm paikneb ruumiliselt lähedal CK2 katalüütilise alaühiku Leu46 karbonüülrühmale (sama uurimisrühma avaldamata andmed), kus võib olla potentsiaali N-asendatud külghela modifikatsiooniks.



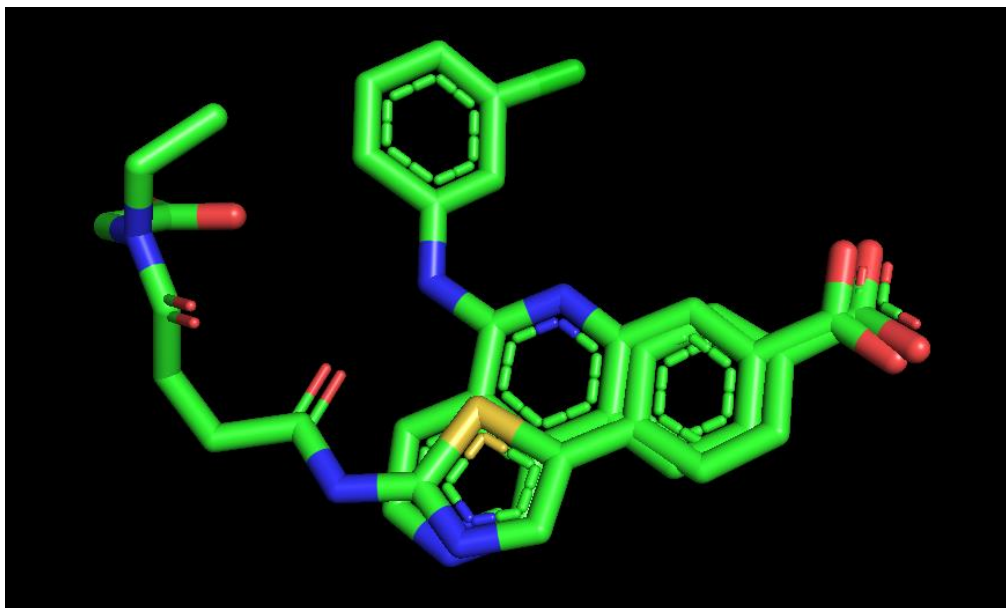
**Joonis 24.** ARC-780:CK2 kompleksi kristallstruktuur (sama uurimisrühma avaldamata andmed). Joonise ülemises osas on ARC-780 struktuurivalem.

Lähtudes eelnevast lõigust, püstitati järgnevad töö eesmärgid:

- 1) Lihtsustada ARC-772 sünteesirada, mis võimaldaks struktuuri valdavalt kokku panna lahustumatul polümeeril ning samas võimaldaks lihtsasti varieerida vahelüli struktuuris paiknevat külghelat.
- 2) Selgitada, kas ARC-772 struktuuris oleva vahelüli struktuuri saab lihtsustada asendades kolmest struktuurifragmendist koosnev vahelüli ühe hargnemata ahelaga dikarboksüülhappe jäägiga.
- 3) Varieerida vahelüli paikneva amiidi lämmastiku küljes oleva külghela struktuuri, et näha selle mõju inhibiitorite võimele seonduda proteiinkinaasiga CK2.

Hiljuti demonstreerisid Wang et al. [34] CX-4945 derivaatide uurimisega, et kui asendada fenüülrühma küljes olev karboksüülrühm hüdroksüetüülkarboksamiidiga, suureneb afiinsus ja selektiivsus CK2 vastu. Selle artikli eeskujul püstitati töö neljas eesmärk:

- 4) rakendada ARC-772 struktuuris samasugust asendust, sest CX-4945 karboksüülrühm paikneb CK2 sidumistaskus samas kohas kui ATB karboksüülrühm (Joonis 25).



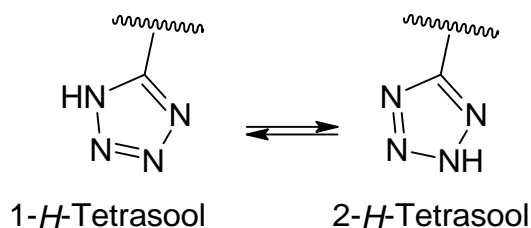
**Joonis 25.** ARC-780 ATP-taskusse seonduva struktuuriosa ning CX-4945 paiknemine CK2 $\alpha$  alaühiku kompleksis (ühitatud kujutis). Kinaasi struktuur on lihtsuse mõttes ümbert kustutatud. CX-4945-CK2 $\alpha$  kompleksi andmed pärinevad kristallstruktuurist koodiga: 6isj, ARC-780-CK2 $\alpha$  – sama uurimisrühma avaldamata andmed.

ARC-772 vahelüli struktuuris on sekundaarne amiid, mis saadakse vastava sekundaarse amiini amideerimisel suktsiinhappeanhüdriidiga. Sekundaarsete amiinide saamiseks on mitmeid meetodeid, näiteks primaarse amiini reaktsioon alküülhaliidiga, aldehüüdiga läbi redutseeriva alküülimise või karboksüülhappega, mille karbonüül hiljem redutseerida. Paraku moodustab esimene variant tertsiarseid amiine või kvaternaarseid ammooniumi soolasid ning teine variant tertsiarseid amiine, kui ei esine steerilist takistust [28]. ARC-772 sünteesiraja lihtsustamiseks leiti kirjandusest, et efektiivne meetod *N*-alküülimiseks on kasutada Fukuyama alküülimist, mis lähtub *Ns*-derivatiseeritud amiinidest [28–31,39]. Lahusefaasis valmistati *Ns*-aminododekaanhappe monomeer, mida edasi kasutati tahkefaassünteesis. Valmistatud monomeer lisati varasemalt tahkele kandjale sünteesitud (iminodiäädikhape)<sub>3</sub> (Ida)<sub>3</sub> peptoidile. Seejärel pandi vaigumaatriksiga reageerima *tert*-butüülrühmaga kaitstud bromoatsetaat, mille järgnes *Ns*-rühma eemaldus. *Ns*-rühma eemaldumisele viitas lahuse värvumine kollakaks. Seejärel liideti ahelaga suktsiinhappe anhüdriid ning viimaks *t*Bu-ATB. Sünteesitud ARC-772 eemaldati vaigult ning toorsaadus analüüsiti HPLC-MS abil. ARC-772 tõestati tuginedes HPLC-MS analüüsile ning järelitati, et meetod oli edukas (Lisa 14). Loodud sünteesirada

lihtsustas struktuuri kokkupanekut lahustumatul polümeeril, mille abil sai kiiresti varieerida vahelüli struktuuris paiknevat külghelat.

Vahelüli struktuuris oleva külghela vajalikkust demonstreeriti ARC-813 – ARC-815 abil, mis olid ARC-772 analoogid, mille vahelülid olid pikkuselt sarnased, kuid need koosnesid ühest hargnemata ahelaga dikarboksüülhappejäägist. Tahkel kandjal olevale peptoidile liideti dikarboksüülhape ning *t*Bu-ATB, mille järel ühendid eemaldati vaigult ning puhastati HPLC-ga. ARC-813 ning ARC-814 sisaldasid mõlemad 16-lülilist hargnemata alküülahelat, kuid erinevus seisnes peptoidahela pikkuses, kus järjestuse pikkus oli vastavalt 3 ning 4 lüli. ARC-815 puhul kasutati vahelüli bis-PEG5 ahelat ning 4-lülilist peptoidahelat. Teostati väljatõrjumiskatsed ning tulemustest esines, et kuivõrd on ARC-813 – ARC-814 hea afiinsed CK2 suhtes, on hargnemata alküülahelaga vahelüliga inhibiitorid väiksema seondumisvõimega (Lisa 15). Tulemustest saab ühtlasi ka järeldada, et mida pikem peptoidahel, seda afiinsem inhibiitor, mis väljendus ka autori bakalaureusetöös. Seeriast madalaima afiinsusega oli ARC-815.

Erinevate külghelate mõju hindamiseks valmistati inhibiitorid ARC-809 – ARC-811. Valmistati atsetamiidi, tetrasooli ning metüülrühmaga külghelad kasutades Fukuyama alküülimisel põhinevat strateegiat. Esmalt kanti tahkel kandjal olevale peptoidahelale Ns-aminododekaanhape, millele liideti vastavad külghelad ning eemaldati Ns-rühm. Järgnes suktsiinhappe ning *t*Bu-ATB liitmine, eemaldati ühendid vaigult ja puhastati HPLC-ga, millest saadi ARC-id 809-811. Eeldusel, et karboksamiid paikneb struktuuris samas kohas kui ARC-780 karboksüülrühm, siis võiks see anda vesiniksideme Leu46 karbonüülrühmaga. Metüülrühm ei anna polaarseid interaktsioone. Tetrasooliderivaadid (Joonis 26) on meditsiinilises keemias kasutusel karboksüülhappe bioisosteeridena ehk karboksüülhapet mimikeerivate struktuuridena. Tetrasoolid on planaarsed struktuurid, mille pKa väärtus on vahemikus ~4,5–4,9, kuid veidi suuremad kui karboksüülhapped ning kristallstruktuuridekohaselt tekitavad tetrasoolid vesiniksidemeid kaugemalt kui vastavad karboksüülhappes derivaadid [40].



**Joonis 26.** Tetrasooli tautomeerid.

Konkureeriva sidumise katsetes ei osutunud külghelas karboksamiidi sisaldav ARC-809 ega metüülrühma sisaldav ARC-811 afiinsemaks kui ARC-772, kuid veapiire arvestades on ühendite  $K_d$  väärtused kokkulangevad. Siiski saab tulemustest järeldada, et vahelüli struktuuris ei pea külghel olema negatiivselt laetud nagu ARC-772 struktuuris, sest metüülrühmaga asendus, mis ei tekita polaarseid interaktsioone, põhjustas sarnase afiinsuse. ARC-810 osutus kõige tugevamini seonduvaks inhibiitoriks uuritud seerias, mis põhjustas üle kahe kordse afiinsuse kasvu (Lisa 16).

Wang et al artikli [34] eeskujul valmistati modifitseeritud ATB, mille karboksüülrühm asendati hüdoksüetüülkarboksamiidiga. Mõõtmistest kajastus asjaolu, et selline asendus pole soositud, sest afiinsus langes märgatavalt (Lisa 17). Tulenevalt ebaõnnestumisest valmistati artiklis esitatud eeskirja järgi ühend **6** ning mõõdeti ka selle seondumist CK2-le ning ka see ei seondunud (Lisa 15). Halb sidumine võis olla põhjustatud mitmest tegurist, näiteks kehvast lahustumisest, ühendi adsorbeerumisest laboriplastiku seintele või eri katsetingimused laborite vahel.

Töös sünteesitud ARC-id on koos dissotsiatsioonikonstantidega esitatud tabelis 2.

**Tabel 2.** Sünteesitud ARC-de struktuurid ja nende CK2-komplekside dissotsiatsioonikonstandid

| Kood    | M [g/mol] | R   | X                                      | $K_d$ [nM]              |
|---------|-----------|---|--|-------------------------|
| ARC-772 | 921       | $-\text{CH}_2\text{COO}^-$                        | $\text{O}^-$                           | $0,094 \pm 0,013^{[a]}$ |
| ARC-809 | 919       | $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$                       | $\text{O}^-$                           | $0,15 \pm 0,06$         |
| ARC-810 | 944       |   | $\text{O}^-$                           | $0,041 \pm 0,001$       |
| ARC-811 | 876       | $-\text{CH}_3$                                    | $\text{O}^-$                           | $0,10 \pm 0,03$         |
| ARC-812 | 963       | $-\text{CH}_2\text{COO}^-$                        | $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ | $_{-}^{[b]}$            |
|         |           |   |  |                         |
| Kood    | M [g/mol] | R   | n                                      | $K_d$ [nM]              |
| ARC-813 | 861       | $-(\text{CH}_2)_{16}-$                            | 3                                      | $0,5 \pm 0,1$           |
| ARC-814 | 976       | $-(\text{CH}_2)_{16}-$                            | 4                                      | $0,35 \pm 0,01$         |
| ARC-815 | 1000      | $-\text{[(CH}_2)_2\text{-O-]}_5\text{-(CH}_2)_2-$ | 4                                      | $3,2 \pm 0,32$          |

<sup>[a]</sup> Kirjanduses on ARC-772  $K_d$  väärtus 0,3 nM [11].

<sup>[b]</sup> 10  $\mu\text{M}$  kontsentratsiooni juures ei toimunud väljatõrjumist.

## Kokkuvõte

Töö eesmärkideks oli: lihtsustada ARC-772 sünteesirada, mis võimaldaks struktuuri valdavalt kokku panna lahustumatul polümeeril ning kiirendada vahelüli struktuuris paikneva külghela varieerimist; selgitada, kas ARC-772 struktuuris oleva vahelüli struktuuri saab lihtsustada kasutades kolmest fragmendist koosneva vahelüli asemel ühte hargnemata ahelaga dikarboksüülhappejääki; varieerida vahelüli paikneva amiidi lämmastiku küljes oleva külghela struktuuri, et näha selle mõju inhibiitorite võimele seonduda CK2-ga ning rakendada ATB karboksüülrühma asendust hüdroksüetüülkarboksamiidiga hiljuti avaldatud artikli eeskujul.

Kõik ühendid sünteesiti tahkel kandjal olevale peptoidahelale, kus vahelüli oleva külghela struktuuri varieeriti Ns-strateegiaga, mis osutus efektiivseks. Töö käigus ilmnes, et ARC-772 vahelüli saab lihtsustada ühe hargnemata dikarboksüülhappega, kuid sellises lähenduses tehakse kompromiss inhibiitori massis, et saavutada ARC-772-ga sarnane afiinsus. Vahelüli külghela struktuuri tetrasooliderivaadiga asendamine tõstis inhibiitori afiinsust võrreldes ARC-772-ga üle kahe korra CK2 vastu ning teiste asendustega ilmnes, et tingimata pole vajalik negatiivse laengu olemasolu vahelüli külghelas. Hüdroksüetüülkarboksamiidiga ATB karboksüülrühma asendamine vähendas inhibiitori afiinsust märgatavalt ning artiklis publitseeritud eeskirja järgi sünteesitud ühend **6** ei sidunud kinaasiga kontsentratsioonini 10  $\mu\text{M}$ .

ARC-772 per-atsetoksümetüülestriga modifitseeritud inhibiitorit on edukalt rakku viidud. Tetrasoolid on sarnased karboksüülhapetega, kuid tetrasolaadid on lipofiilsemad kui vastavad karboksülaadid. Võimalik töö edasiarendus on ARC-772 struktuuris olevate karboksüülhapete asendamine tetrasooliga, mis tulenevalt lipofiilsusest võivad kaotada seniks vajaliku lisaetapi, et viia inhibiitor läbi rakumembraani.

**CERCS** koodid: P390 Orgaaniline keemia, P310 Proteiinid, ensümolooia, T151 Optilised materjalid

## **Kasutatud kirjandus**

1. D. Fabbro, S.W. Cowan-Jacob, H. Moebitz, Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. Br J Pharmacol. 172 (2015) 2675. <https://doi.org/10.1111/bph.13096>.
2. P.A. Schwartz, B.W. Murray, Protein kinase biochemistry and drug discovery. Bioorganic Chemistry. 39 (2011) 192. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>.
3. G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome. Science. 298 (2002) 1912. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
4. K.S. Bhullar, N.O. Lagarón, E.M. McGowan, I. Parmar, A. Jha, B.P. Hubbard, H.P.V. Rupasinghe, Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. Molecular Cancer. 17 (2018) 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>.
5. P. Cohen, The origins of protein phosphorylation. Nature Cell Biology. 4 (2002) 127. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e127>.
6. R. Roskoski, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. Pharmacological Research. 144 (2019) 19. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>.
7. FDA-approved protein kinase inhibitors/US Food and Drug Administration approved small molecule protein kinase inhibitors. <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm> (viimati avatud 22.05.2022).
8. H. Lian, M. Su, Y. Zhu, Y. Zhou, S.H. Soomro, H. Fu, Protein kinase CK2, a potential therapeutic target in carcinoma management. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 20 (2019) 23. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.23>.
9. S.E. Roffey, D.W. Litchfield, CK2 Regulation: Perspectives in 2021. Biomedicines. 9 (2021) 1361. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101361>.
10. C. Franchin, C. Borgo, S. Zaramella, L. Cesaro, G. Arrigoni, M. Salvi, L.A. Pinna, Exploring the CK2 paradox: Restless, dangerous, dispensable. Pharmaceuticals. 10 (2017) 11. <https://doi.org/10.3390/ph10010011>.

11. H. Rahnel, K. Viht, D. Lavogina, O. Mazina, T. Haljasorg, E. Enkvist, A. Uri, A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation. *ChemMedChem*. 12 (2017) 1723. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700457>.
12. M. Montenarh, Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res*. 342 (2010) 139. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1068-3>.
13. L.A. Pinna, Protein kinase CK2: a challenge to canons. *Journal of Cell Science*. 115 (2002) 3873. <https://doi.org/10.1242/jcs.00074>.
14. F. Pierre, P.C. Chua, S.E. Obrien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M.K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J.P. Whitten, T.K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W.G. Rice, D.M. Ryckman, 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. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54 (2011) 635. <https://doi.org/10.1021/jm101251q>.
15. M. Bouhaddou, D. Memon, B. Meyer, K.M. White, V.V. Rezelj, M. Correa Marrero, B.J. Polacco, J.E. Melnyk, S. Ulferts, R.M. Kaake, J. Batra, A.L. Richards, E. Stevenson, D.E. Gordon, A. Rojc, K. Obernier, J.M. Fabius, M. Soucheray, L. Miorin, E. Moreno, C. Koh, Q.D. Tran, A. Hardy, R. Robinot, T. Vallet, B.E. Nilsson-Payant, C. Hernandez-Armenta, A. Dunham, S. Weigang, J. Knerr, M. Modak, D. Quintero, Y. Zhou, A. Dugourd, A. Valdeolivas, T. Patil, Q. Li, R. Hüttenhain, M. Cakir, M. Muralidharan, M. Kim, G. Jang, B. Tutuncuoglu, J. Hiatt, J.Z. Guo, J. Xu, S. Bouhaddou, C.J.P. Mathy, A. Gaulton, E.J. Manners, E. Félix, Y. Shi, M. Goff, J.K. Lim, T. McBride, M.C. O’Neal, Y. Cai, J.C.J. Chang, D.J. Broadhurst, S. Klippsten, E. De Wit, A.R. Leach, T. Kortemme, B. Shoichet, M. Ott, J. Saez-Rodriguez, B.R. tenOever, R.D. Mullins, E.R. Fischer, G. Kochs, R. Grosse, A. García-Sastre, M. Vignuzzi, J.R. Johnson, K.M. Shokat, D.L. Swaney, P. Beltrao, N.J. Krogan, The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*. 182 (2020) 685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.034>.
16. C.R. MD, A Phase II, Randomized and Controlled Investigator Initiated Trial Evaluating Safety, Pharmacokinetics and Clinical Benefit of Silmitasertib (CX-4945) in Outpatient Adult Subjects With Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04663737> (viimati avatud 11.05.2022).

17. University of Arizona, Phase II, Randomized, Investigator Initiated Trial to Evaluate Safety and to Explore Clinical Benefit of Silmitasertib (CX-4945) in Patients With Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *clinicaltrials.gov*, 2021. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04668209> (viimati avatud 11.05.2022).
18. A. Uri, M. Lust, A. Vaasa, D. Lavogina, K. Viht, E. Enkvist, Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1804 (2010) 541. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.019>.
19. D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: from Principle to Practical Applications. *ChemMedChem*. 5 (2010) 23. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900252>.
20. J. Vahter, K. Viht, A. Uri, G. babu Manoharan, E. Enkvist, Thiazole- and selenazole-comprising high-affinity inhibitors possess bright microsecond-scale photoluminescence in complex with protein kinase CK2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 26 (2018) 5062. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.003>.
21. E. Enkvist, K. Viht, N. Bischoff, J. Vahter, S. Saaver, G. Raidaru, O.-G. Issinger, K. Niefind, A. Uri, A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org. Biomol. Chem*. 10 (2012) 8645. <https://doi.org/10.1039/c2ob26022k>.
22. K. Viht, S. Saaver, J. Vahter, E. Enkvist, D. Lavogina, H. Sinijärvi, G. Raidaru, B. Guerra, O.-G. Issinger, A. Uri, Acetoxymethyl Ester of Tetrabromobenzimidazole–Peptoid Conjugate for Inhibition of Protein Kinase CK2 in Living Cells. *Bioconjugate Chemistry*. 26 (2015) 2324. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00383>.
23. J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed, Springer, New York, 2006, pp. 353-605.
24. luminescence | physics | Britannica. <https://www.britannica.com/science/luminescence> (viimati avatud 13.05.2022).
25. D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 2007, pp. 399-405.
26. P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, Boca Raton, 1997.

27. A.S. Culf, R.J. Ouellette, Solid-phase synthesis of N-substituted glycine oligomers ( $\alpha$ -peptoids) and derivatives. *Molecules*. 15 (2010) 5282. <https://doi.org/10.3390/molecules15085282>.
28. T. Kan, T. Fukuyama, New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.* 4 (2004) 353. <https://doi.org/10.1039/B311203A>.
29. W.-J. Fang, T. Yakovleva, J.V. Aldrich, A convenient approach to synthesizing peptide C-terminal N-alkyl amides. *Biopolymers*. 96 (2011) 715. <https://doi.org/10.1002/bip.21600>.
30. S.C. Miller, T.S. Scanlan, *o*NBS–SPPS: A New Method for Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 2690. <https://doi.org/10.1021/ja974252k>.
31. E. Biron, J. Chatterjee, H. Kessler, Optimized selective N-methylation of peptides on solid support. *J. Peptide Sci.* 12 (2006) 213. <https://doi.org/10.1002/psc.711>.
32. Fukuyama Amine Synthesis. *Chem-Station Int. Ed.* (2014). <https://en.chemstation.com/reactions-2/2014/03/fukuyama-amine-synthesis.html> (viimati avatud 13.05.2022).
33. Yu.V. Grigor'ev, P.N. Gaponik, G.I. Koldobskii, Tritylation of Tetrazole and 5-Substituted Tetrazoles with Triphenylmethanol. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 37 (2001) 1670. <https://doi.org/10.1023/A:1013849329273>.
34. Y. Wang, Z. Lv, F. Chen, X. Wang, S. Gou, Discovery of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[*c*][2,6]naphthyridine Derivatives as Highly Selective CK2 Inhibitors with Potent Cancer Cell Stemness Inhibition. *J. Med. Chem.* 64 (2021) 5082. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00131>.
35. A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK. *Analytical Biochemistry*. 385 (2009) 85. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.030>.
36. E. Enkvist, D. Lavogina, G. Raidaru, A. Vaasa, I. Viil, M. Lust, K. Viht, A. Uri, Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basic protein kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49 (2006) 7150. <https://doi.org/10.1021/jm0605942>.

37. D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: from Principle to Practical Applications. *ChemMedChem*. 5 (2010) 23. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900252>.
38. A. Issajev, Anioonse fragmendi mõju proteiinkinaaside CK2 ja DYRK1A inhibiitorite afiinsusele, Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 2018. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/61417> (viimati avatud 23.05.2022).
39. G. Prabhu, M. Krishnamurthy, M. Samarasimhareddy, N. Narendra, V.V. Sureshababu, Design and Synthesis of a Novel N-(1H-tetrazol-5-yl)methyl Cyclic Peptoid Using Nosyl-protected N-(1-trityl-1H-tetrazol-5-yl)methyl Substituted Glycine. *Int J Pept Res Ther*. 23 (2017) 493. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9581-9>.
40. C. Ballatore, D.M. Huryn, A.B. Smith, Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design. *ChemMedChem*. 8 (2013) 385. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200585>.

## **Lisad**

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

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

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

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

**Lisa 5.** ARC-809 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 6.** ARC-810 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 7.** ARC-811 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 8.** ARC-812 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 9.** ARC-813 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 10.** ARC-814 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 11.** ARC-815 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 12.** Ühend **6** UV-kromatogramm ja massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 13.** Aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramine.

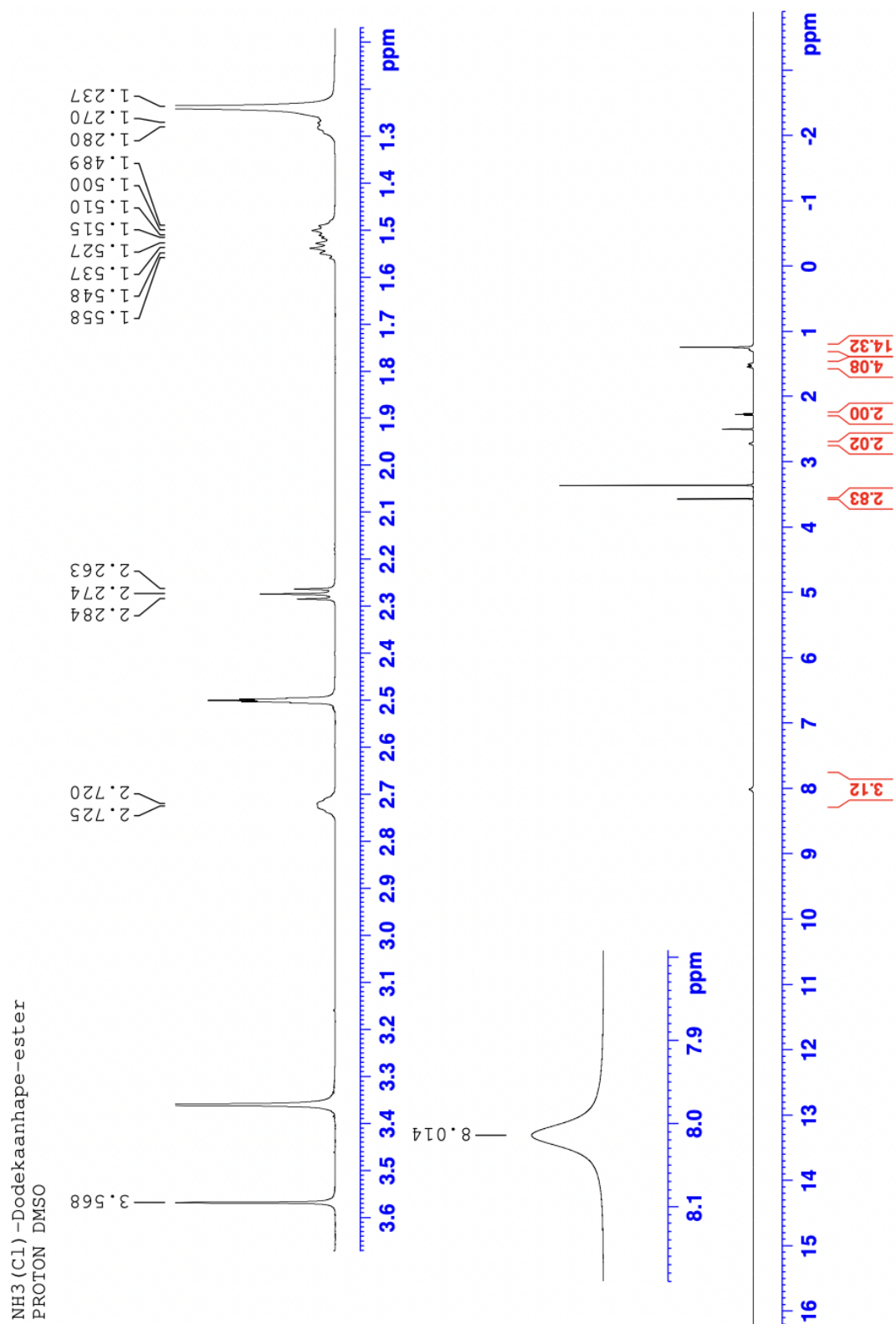
**Lisa 14.** Uue sünteesiraja järgi valmistatud ARC-772 toorsaaduse UV-kromatogramm ja massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

**Lisa 15.** ARC-813 – ARC-815, ühend **6** väljatõrjumiskõverad. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.

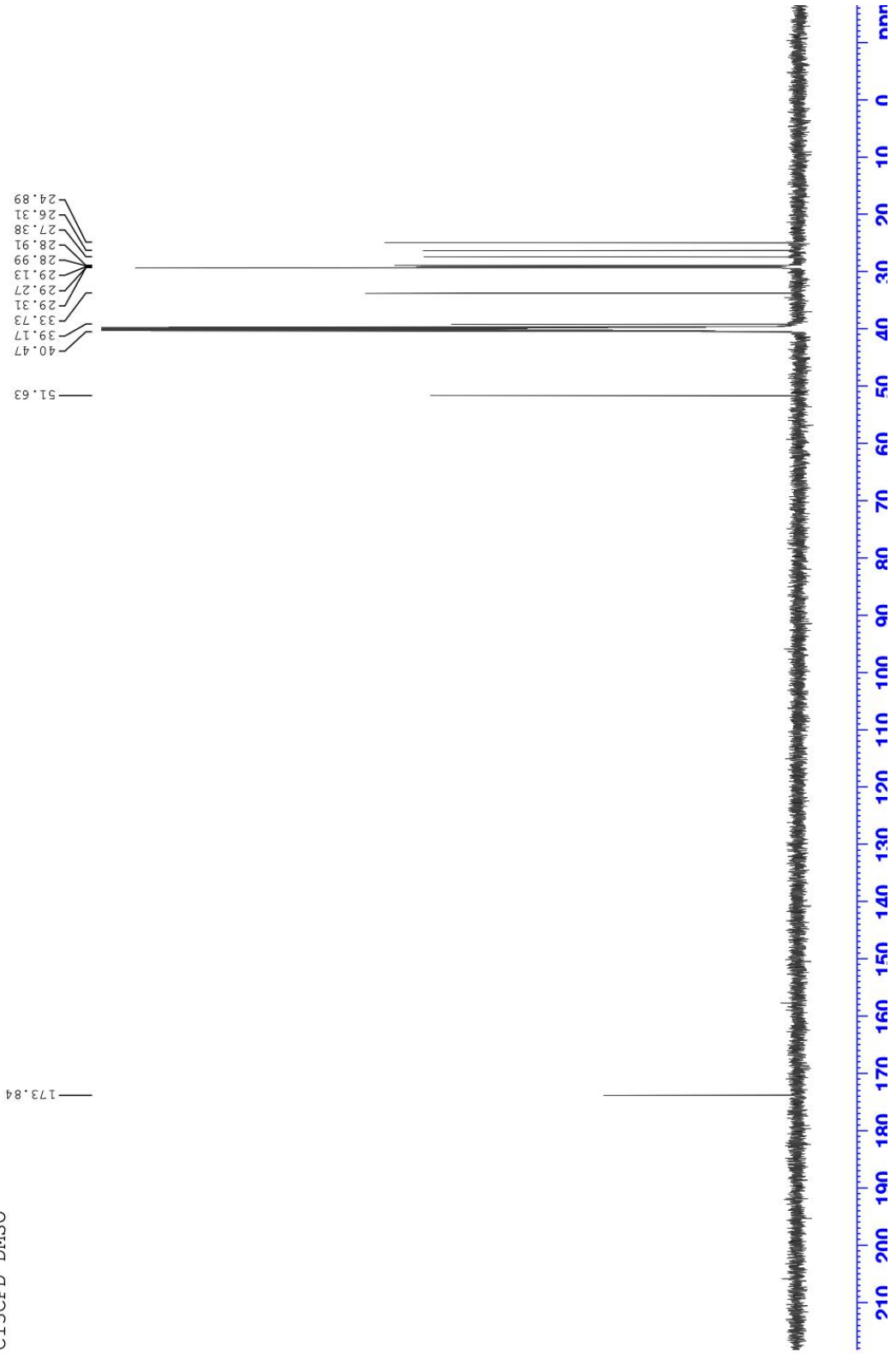
**Lisa 16.** ARC-809 – ARC-811 väljatõrjumiskõverad. Konkureerivaks inhibiitoriks ARC-784.

**Lisa 17.** ARC-812 väljatõrjumiskõver. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.

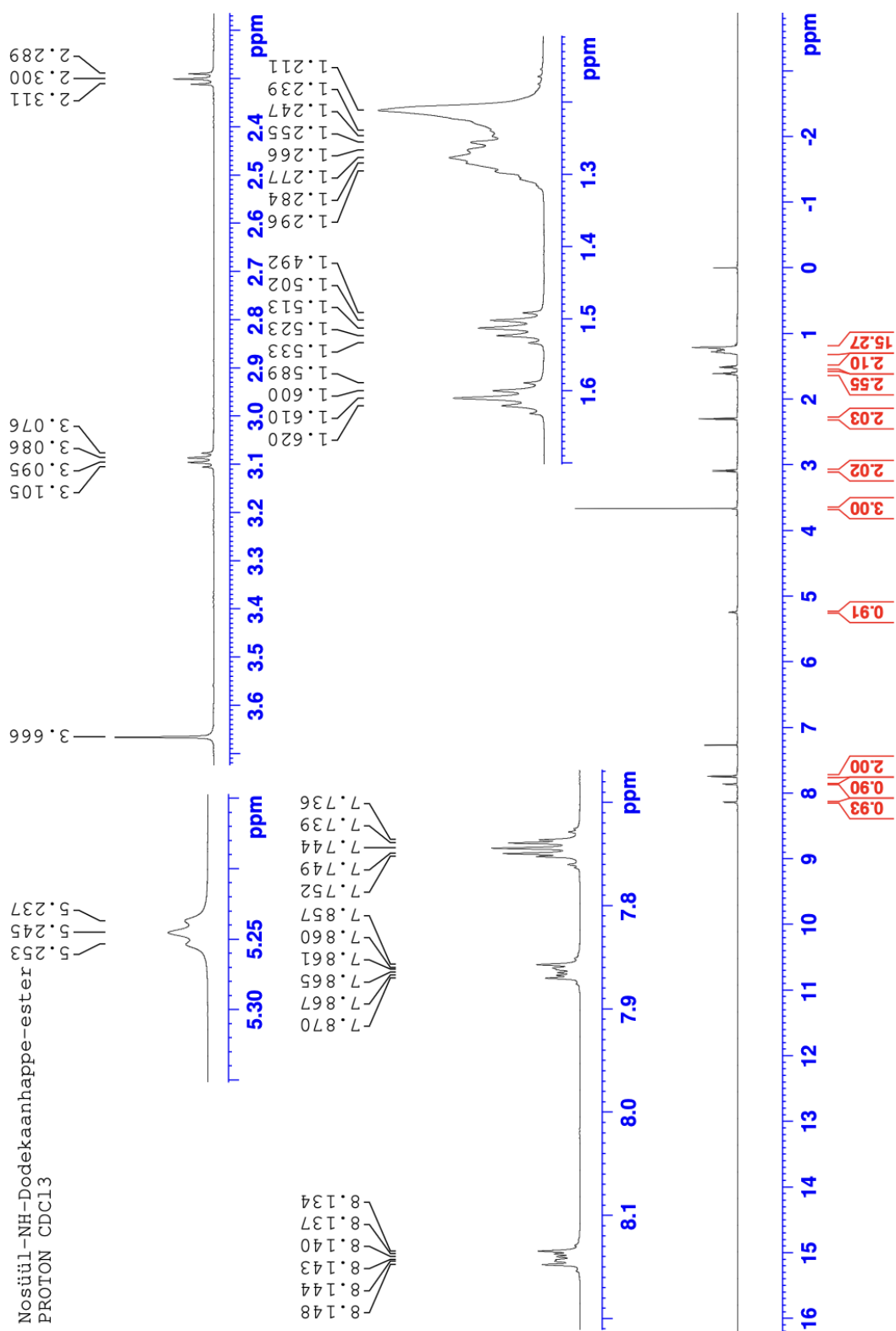
Lisa 1. Ühendi 1 <sup>1</sup>H ja <sup>13</sup>C spektrid (kahel lehel).



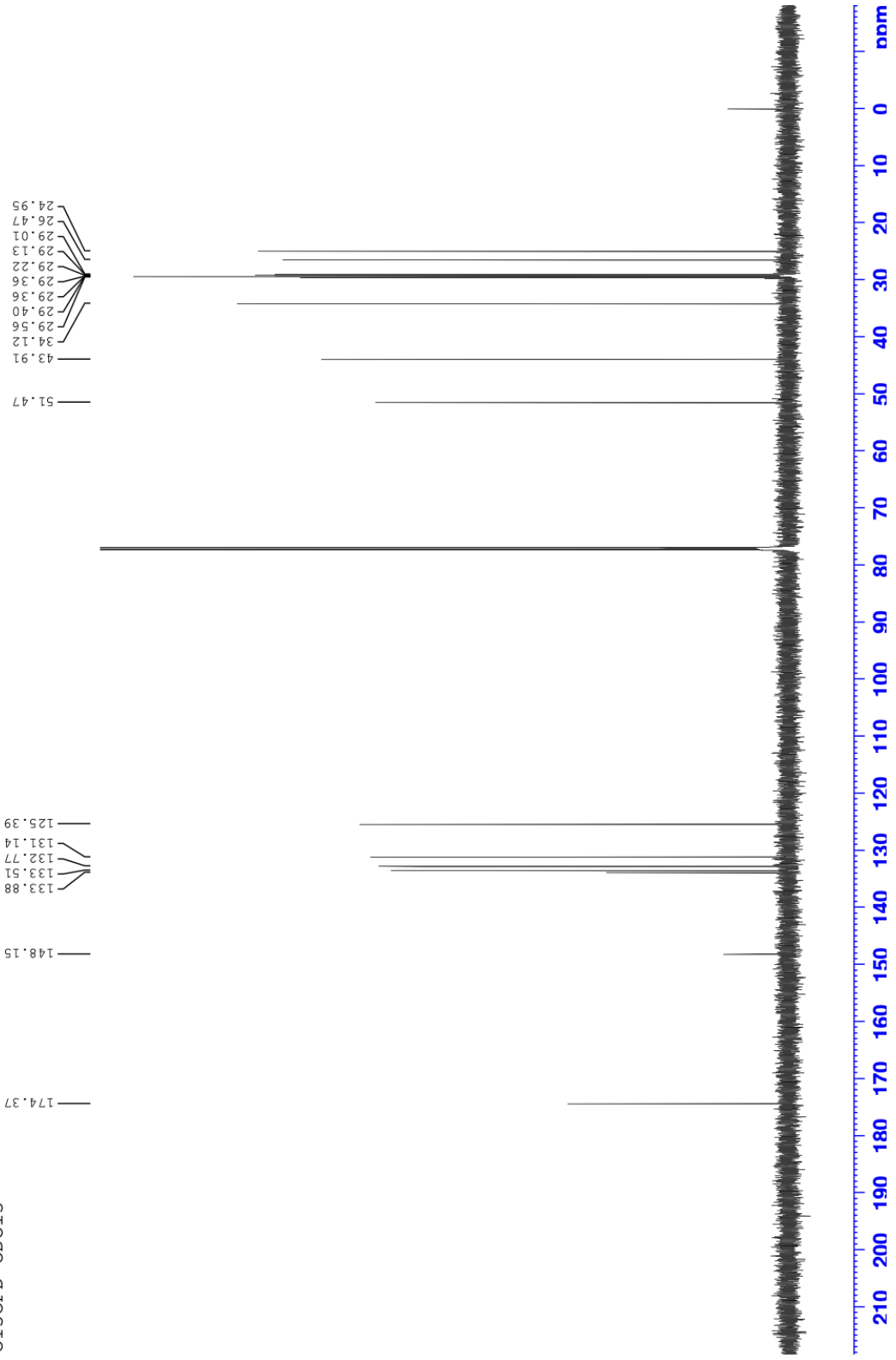
NH3 (C1) -Dodekaanhape-ester  
C13CPD DMSO



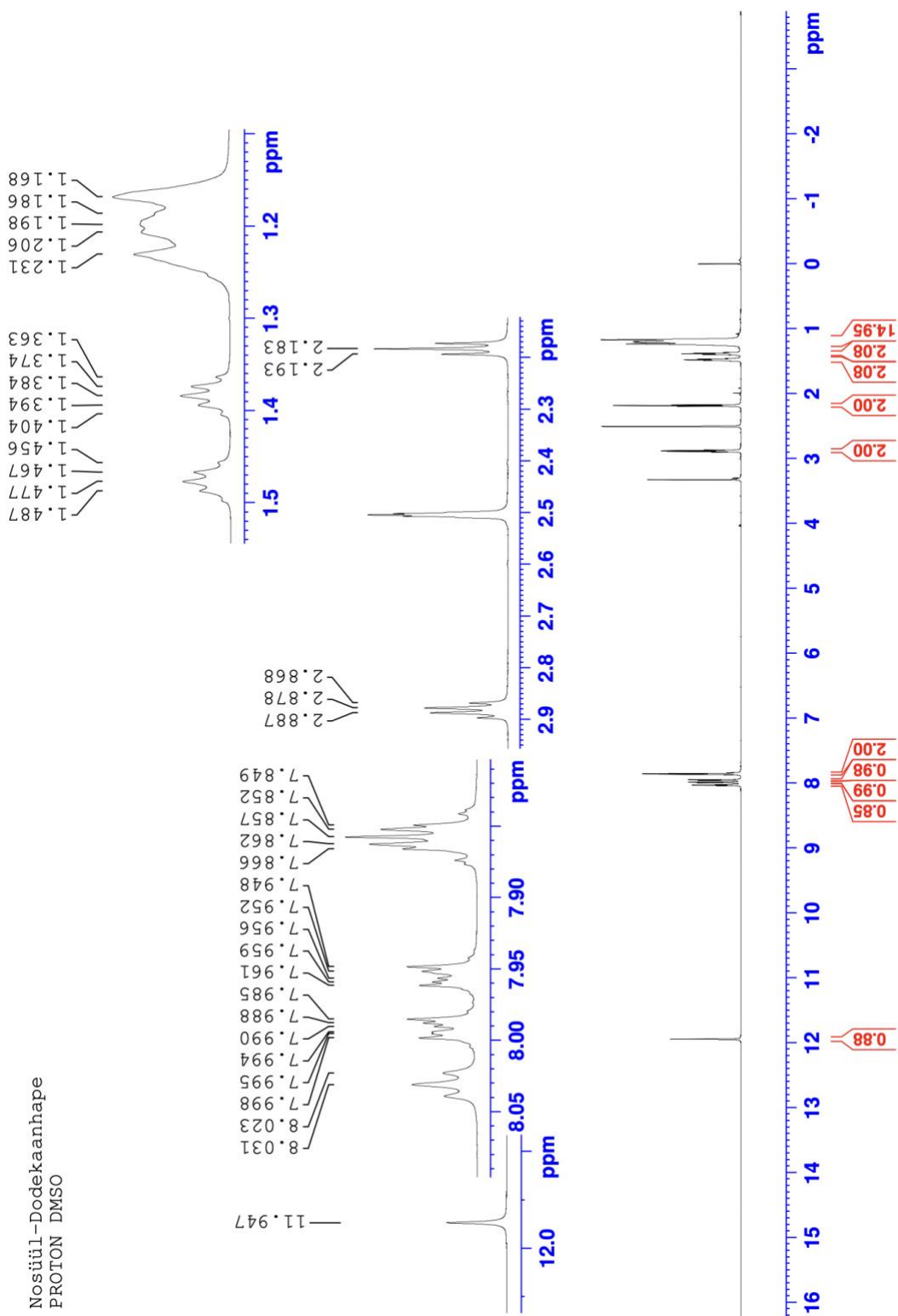
Lisa 2. Ühendi 2  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  TMR spektrid (kahel lehel).



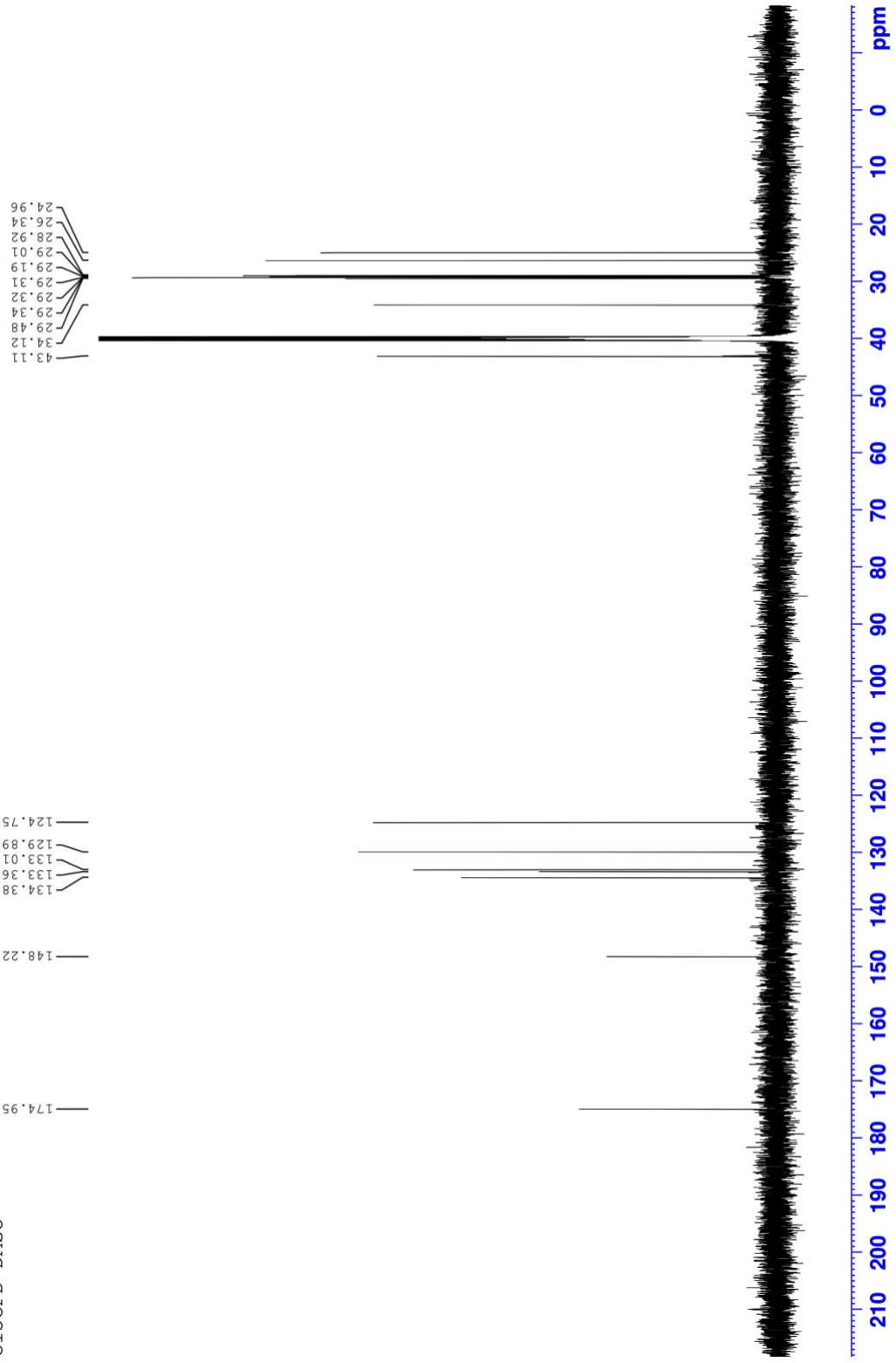
Nosüül-NH-Dodekaanhappe-ester  
C13CPD CDC13



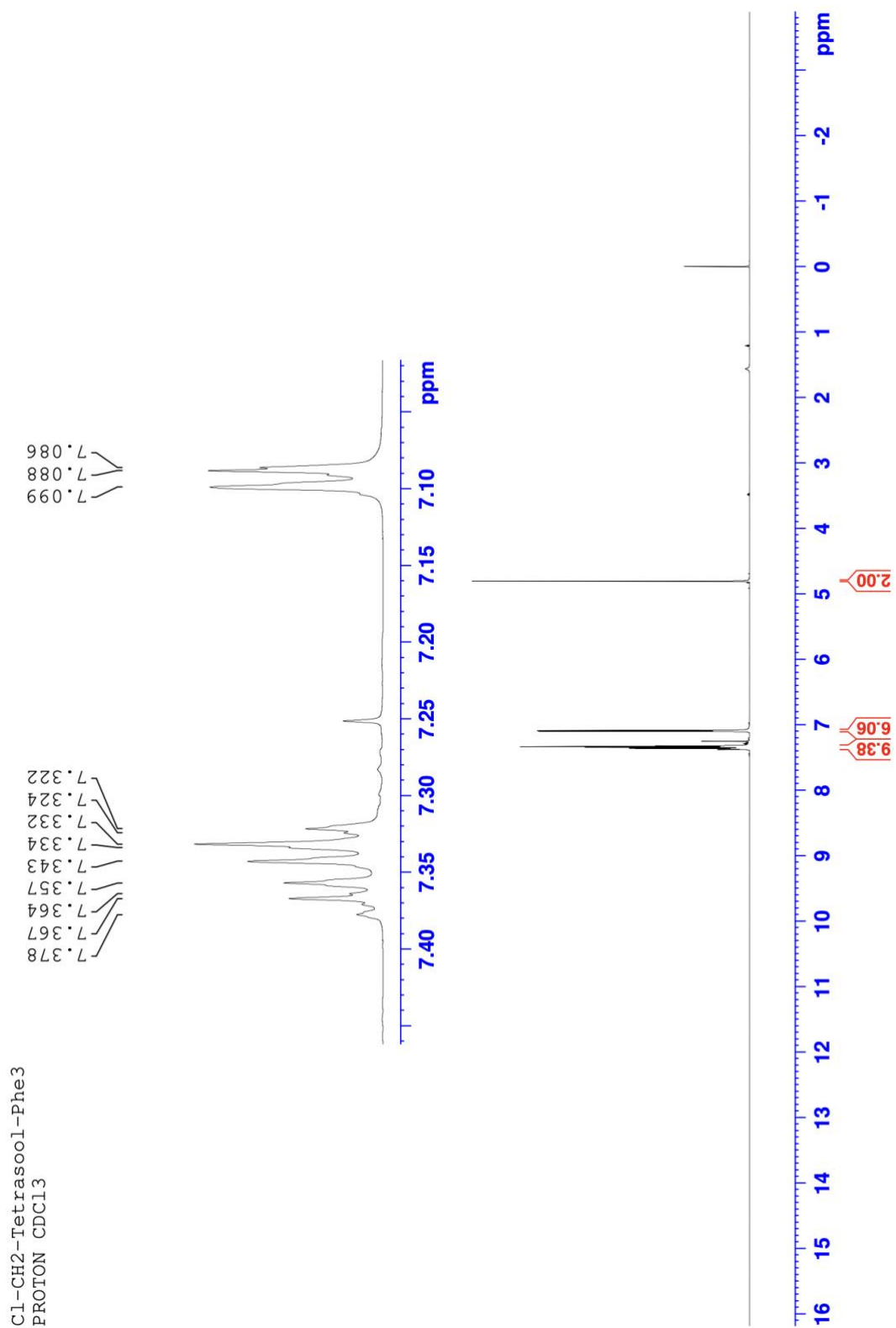
Lisa 3. Ühendi 3  $^1\text{H}$  ja  $^{13}\text{C}$  spektrid (kahel lehel).



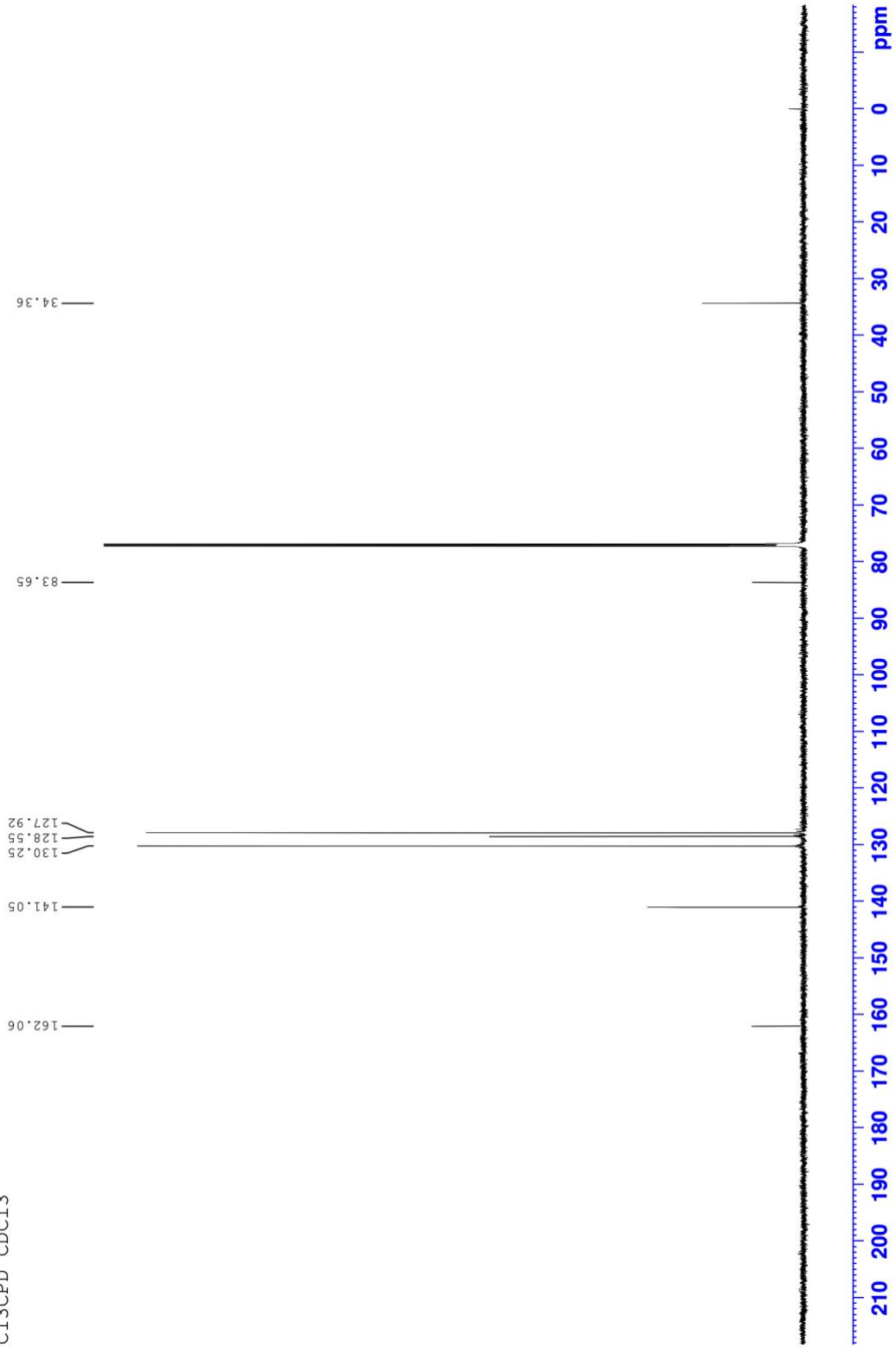
Nosüül-Dodekaanhape  
C13CPD DMSO



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

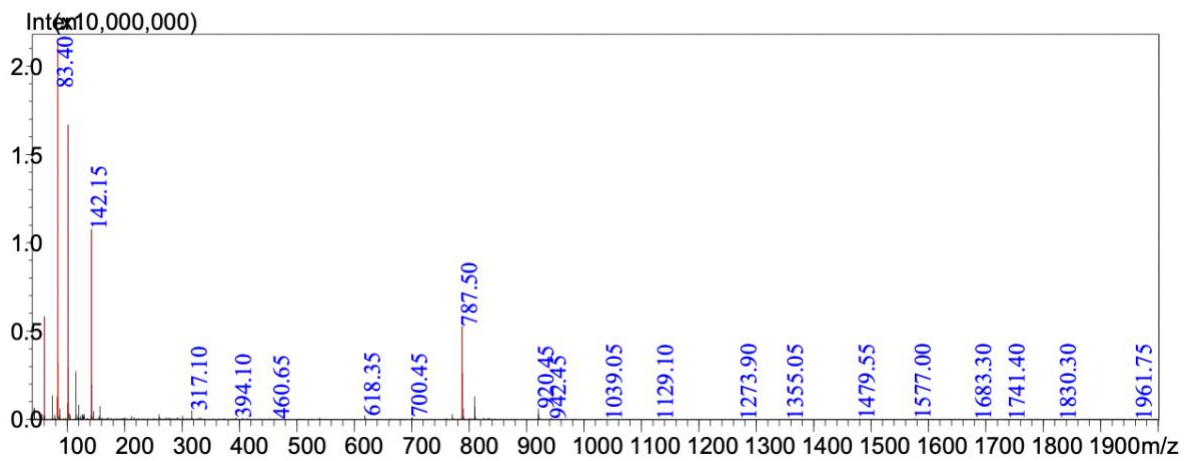
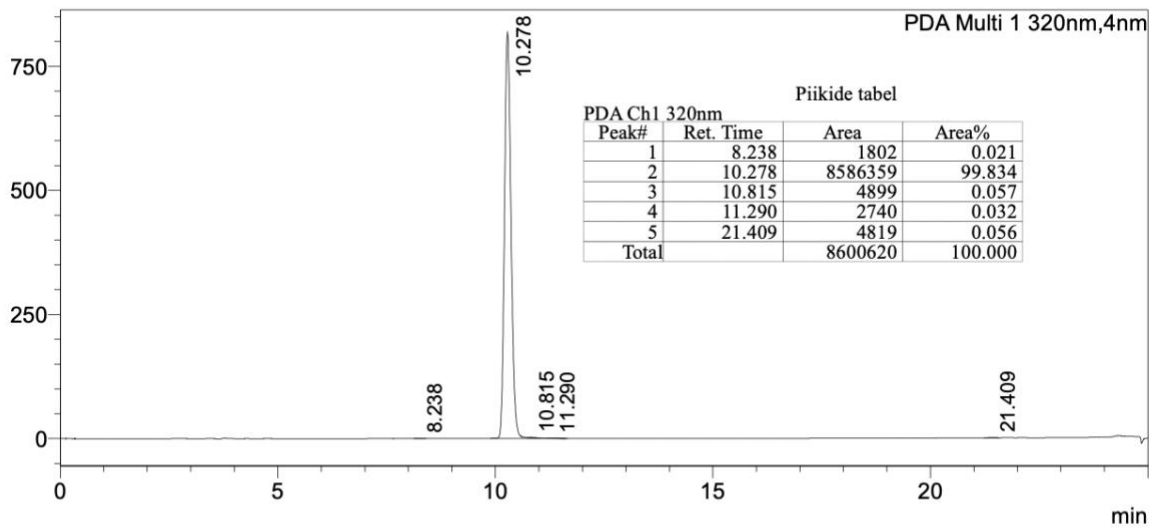


C1-CH2-Tetrasool-Phe3  
C13CPD CDCl3

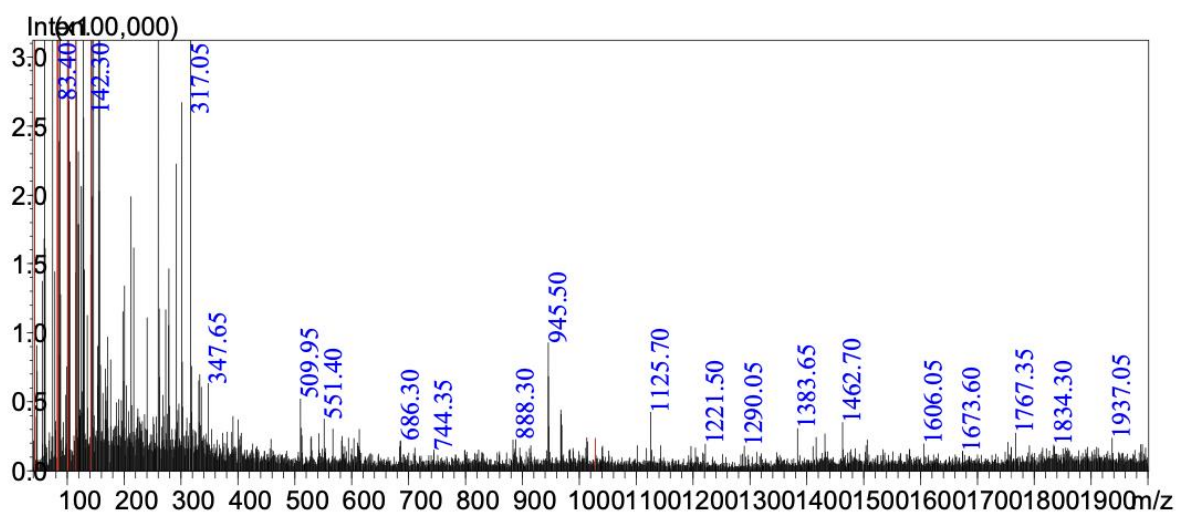
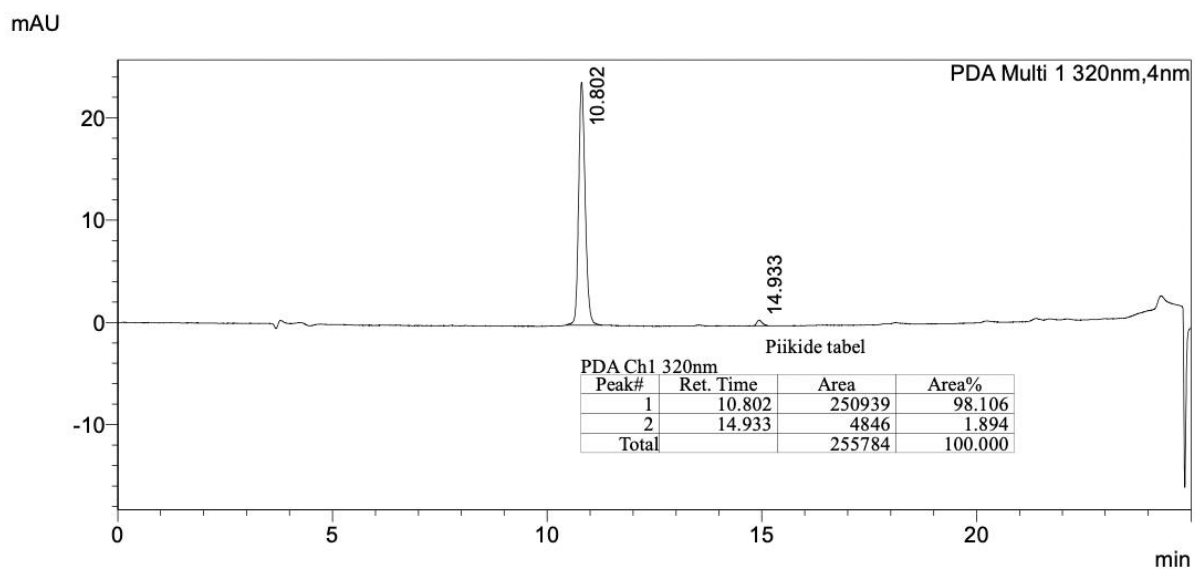


**Lisa 5.** ARC-809 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

mAU

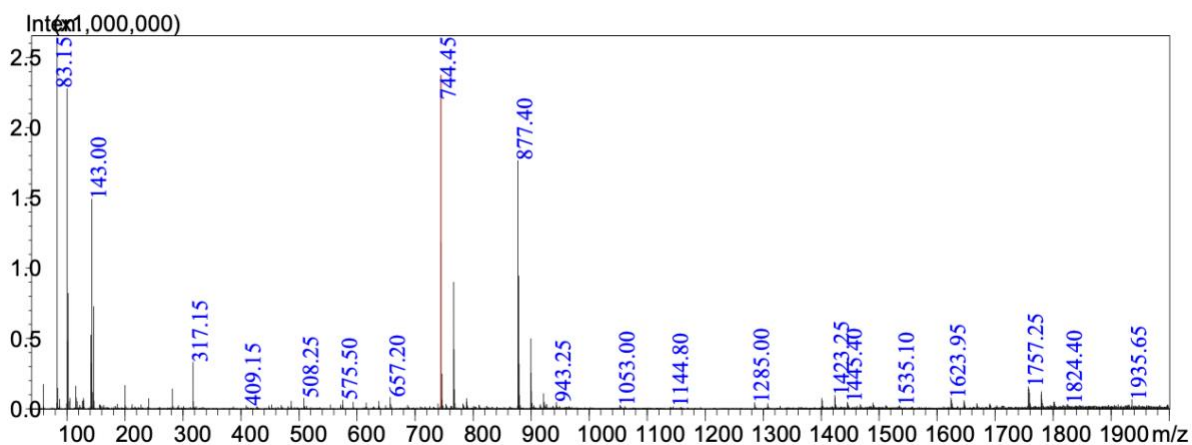
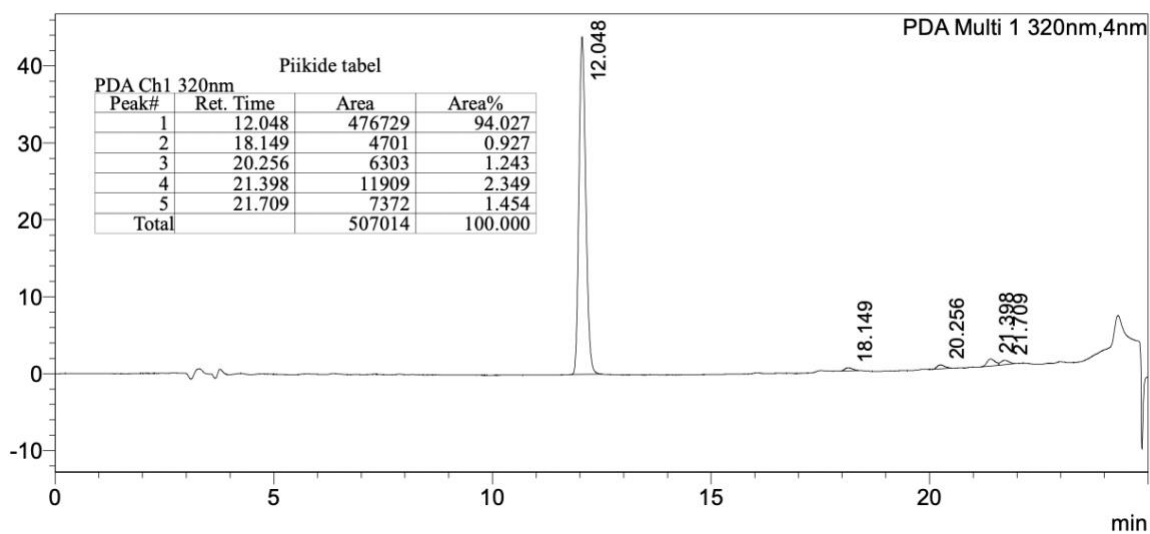


**Lisa 6.** ARC-810 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

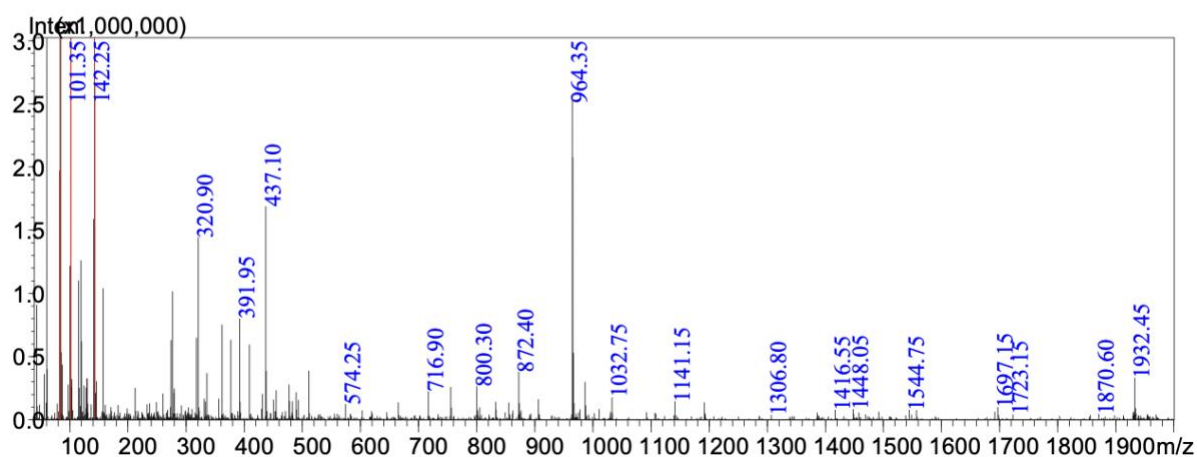
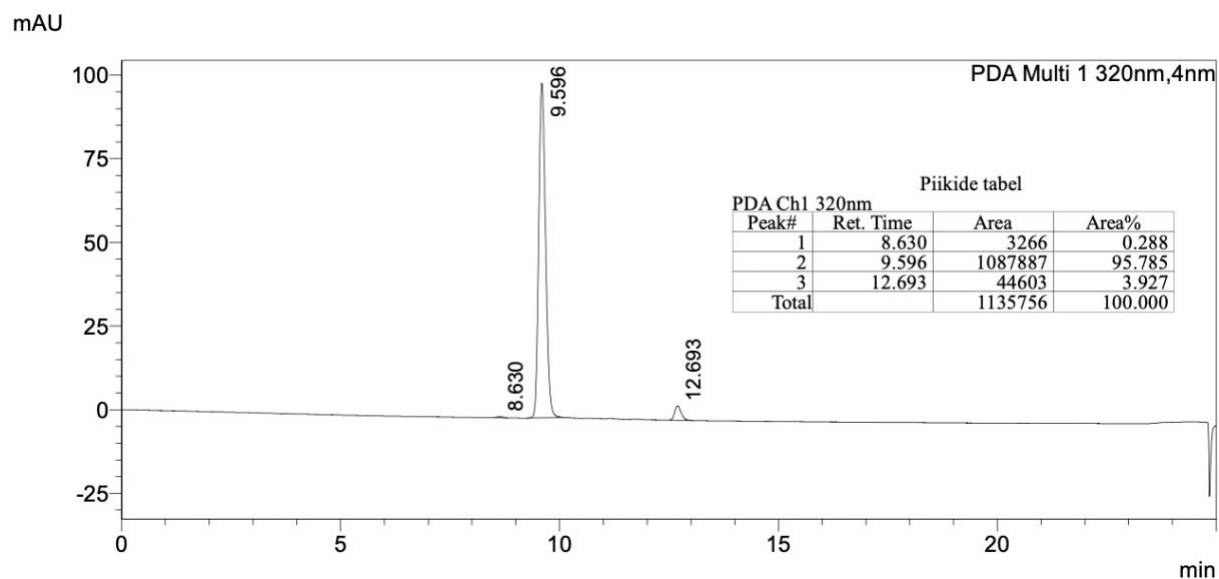


**Lisa 7.** ARC-811 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

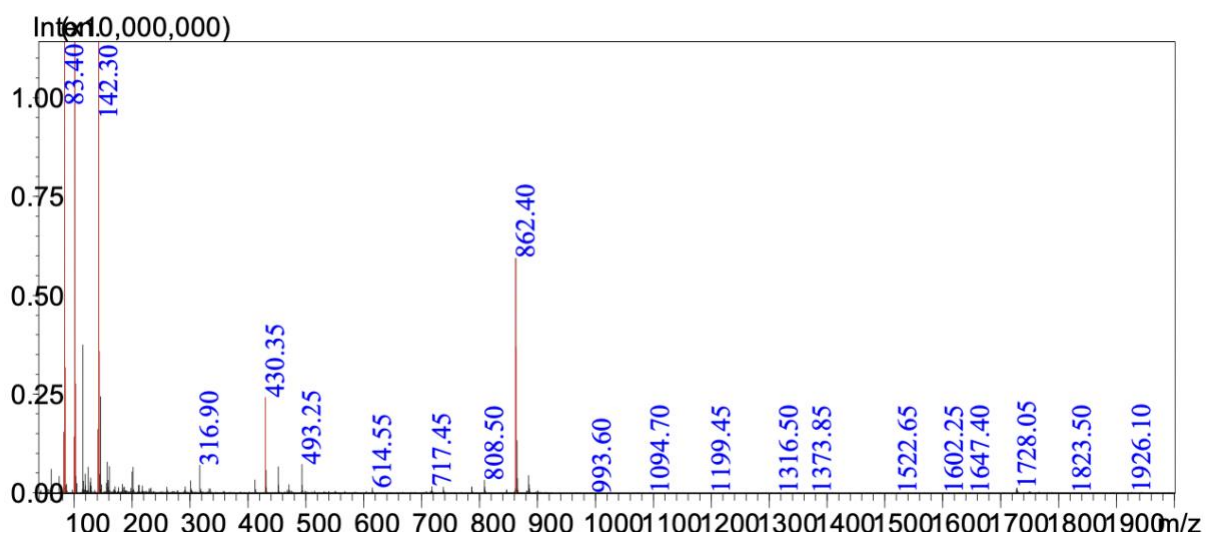
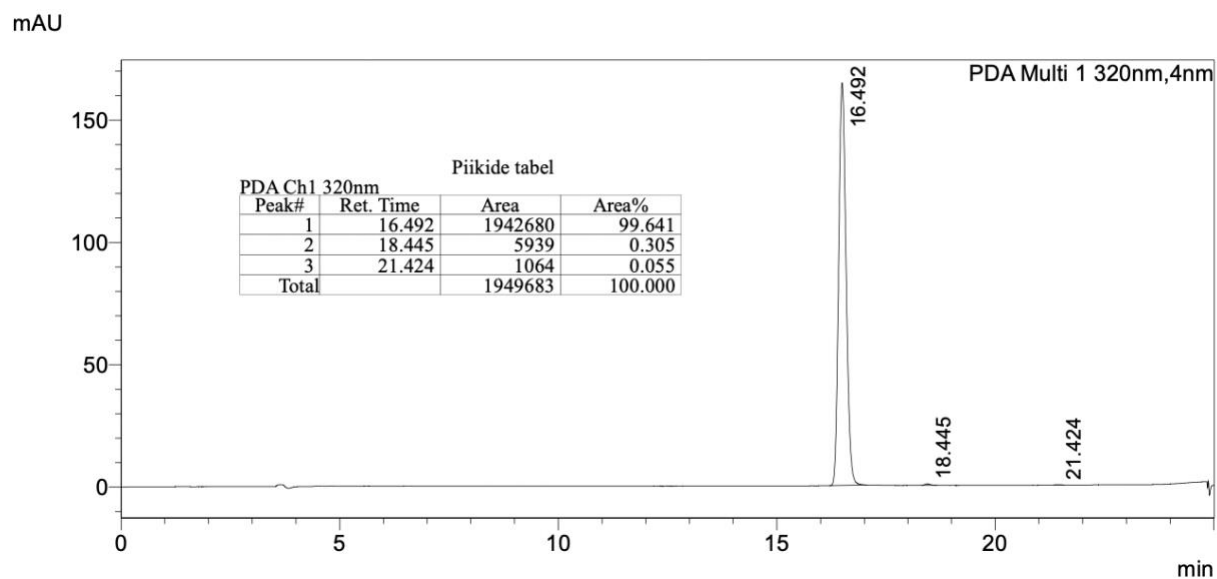
mAU



**Lisa 8.** ARC-812 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

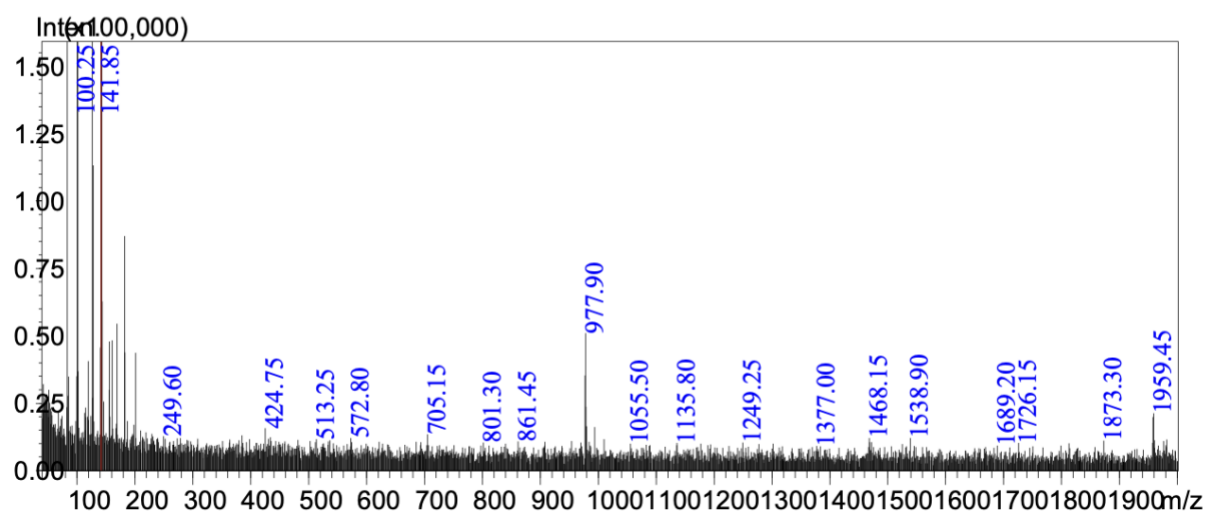
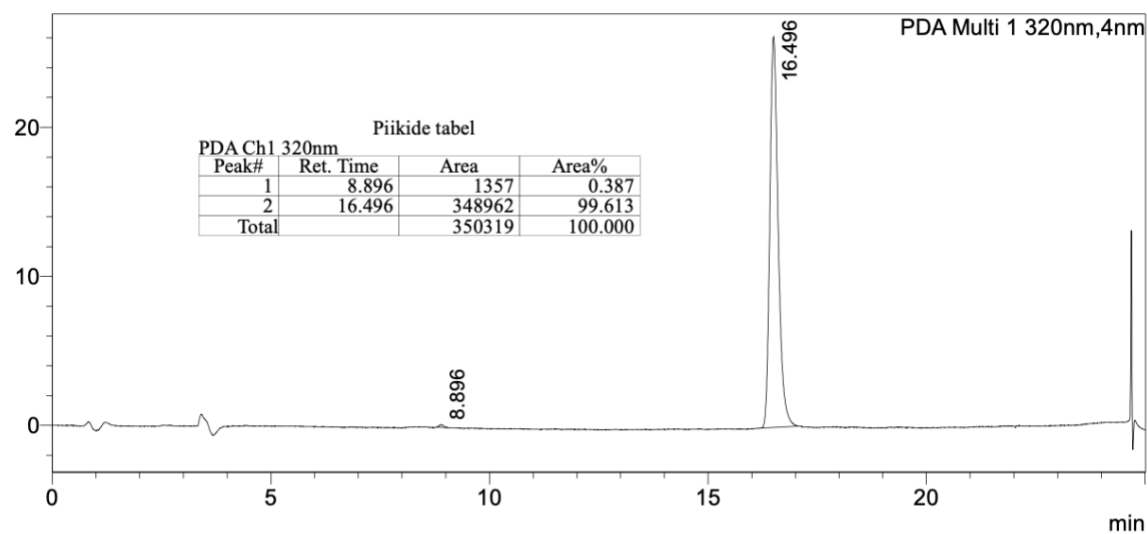


**Lisa 9.** ARC-813 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

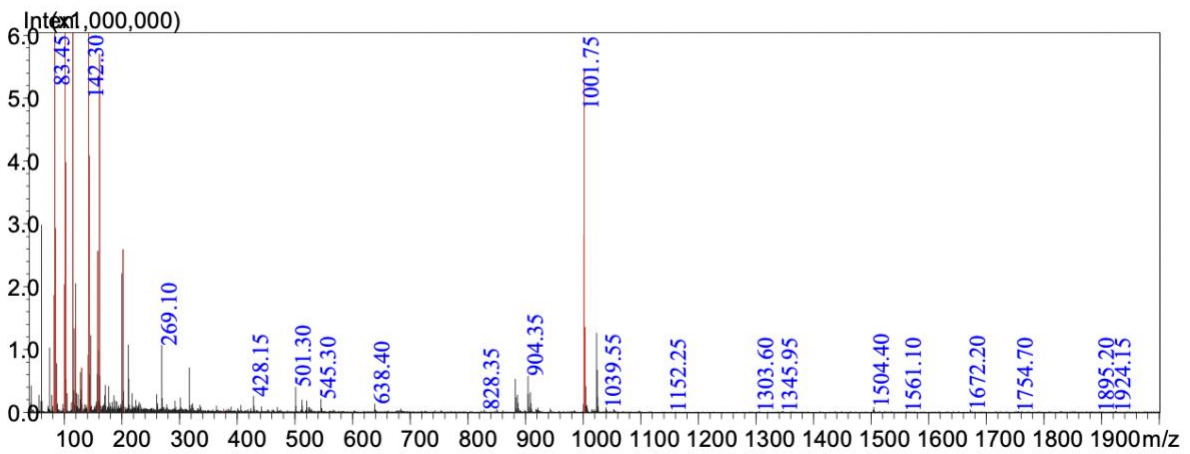
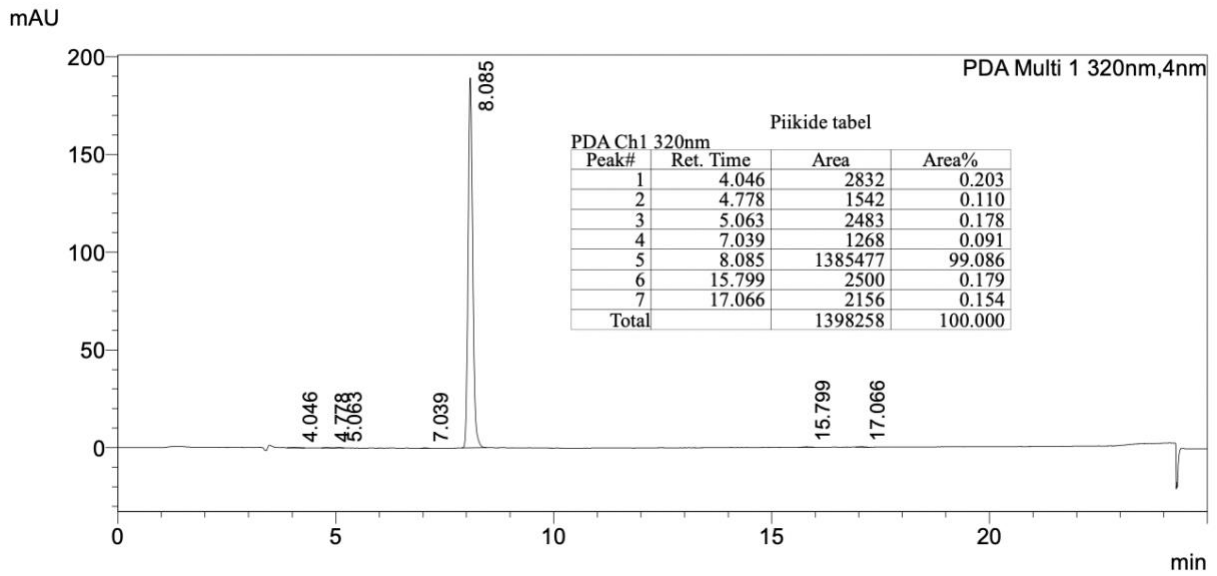


**Lisa 10.** ARC-814 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

mAU

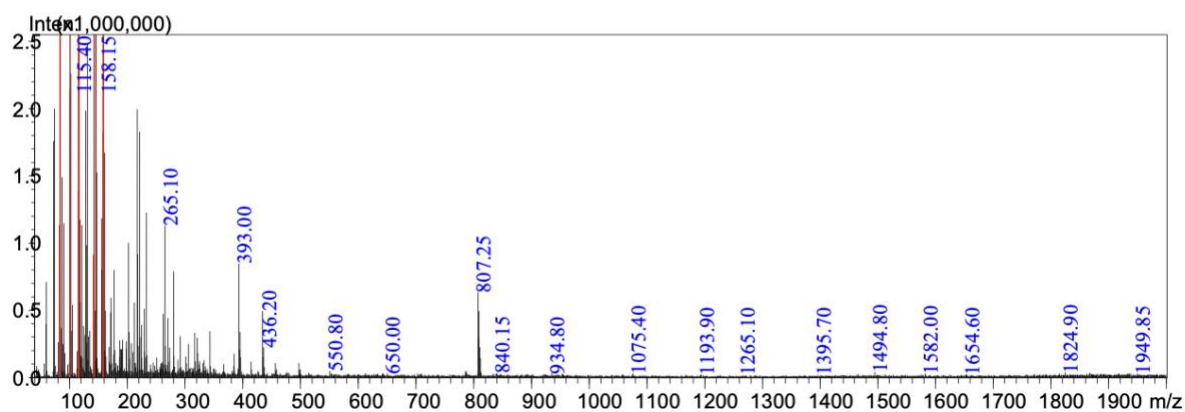
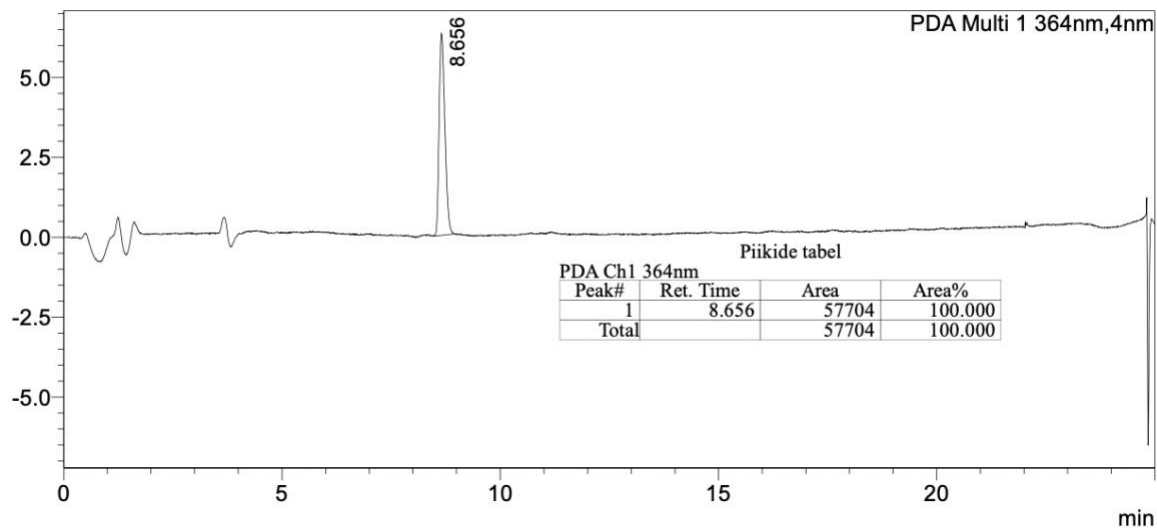


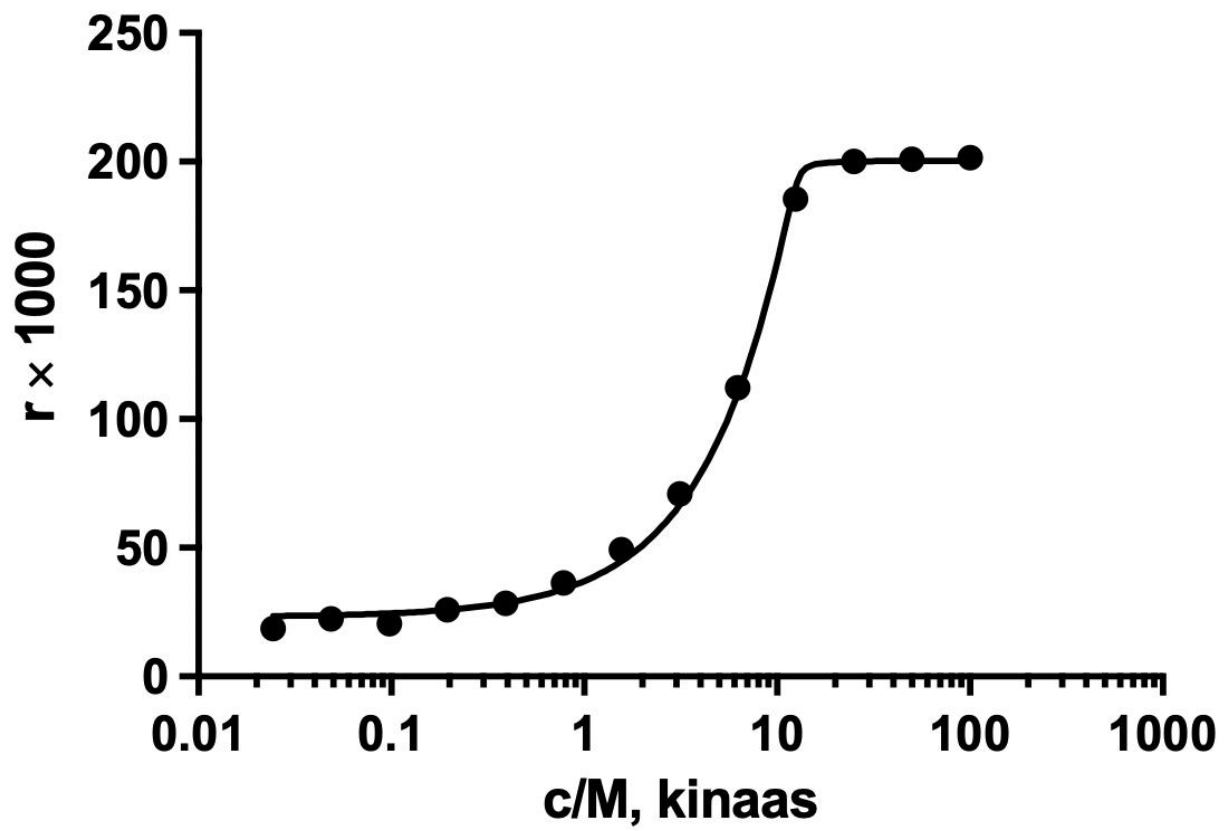
**Lisa 11.** ARC-815 UV-kromatogramm ning massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.



**Lisa 12.** Ühend 6 UV-kromatogramm ja massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

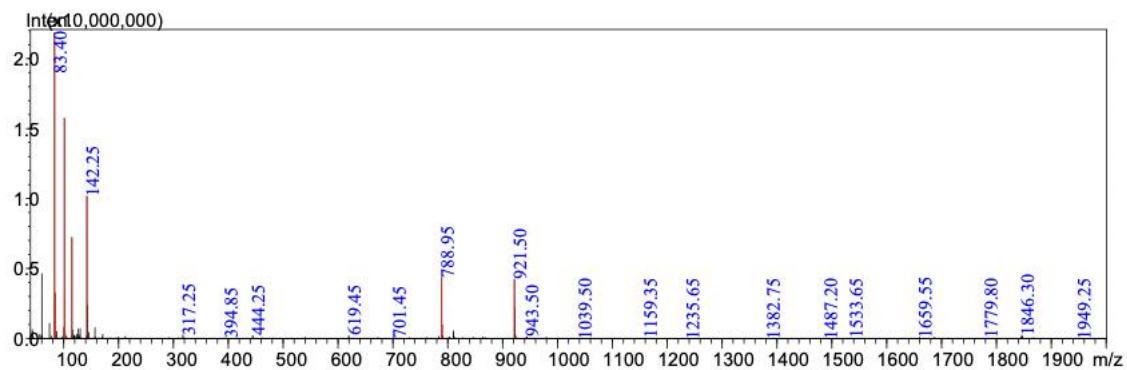
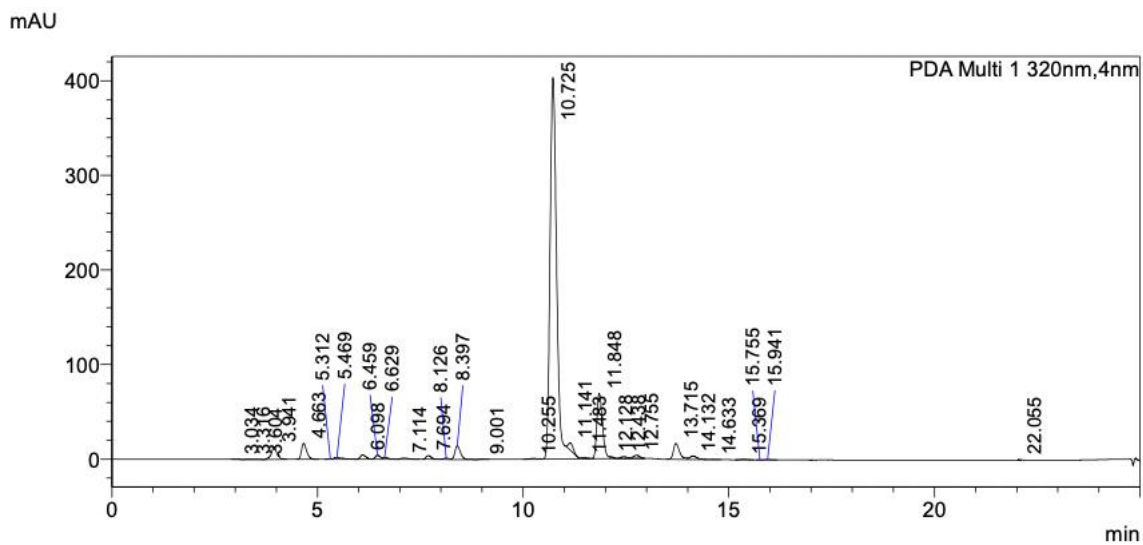
mAU





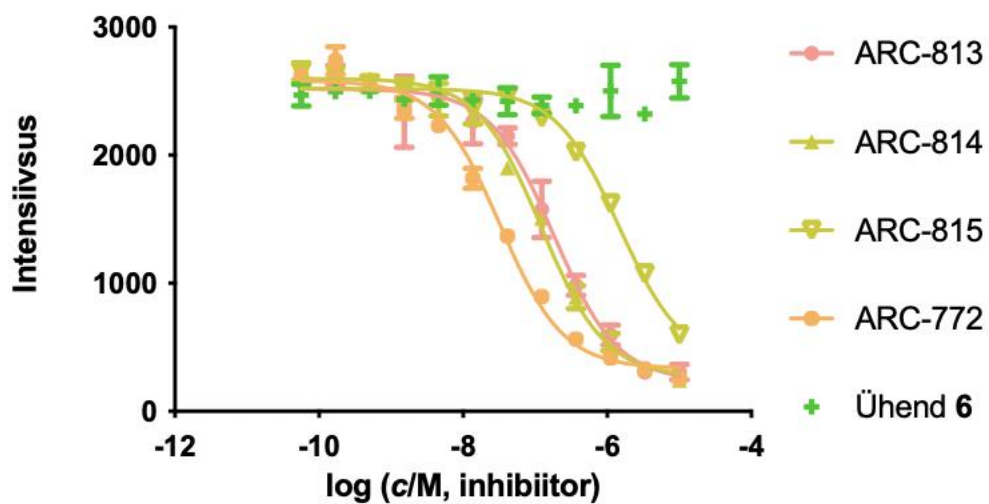
Lisa 13. Näide aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramisest

**Lisa 14.** Uue sünteesiraja järgi valmistatud ARC-772 toorsaaduse UV-kromatogramm ja massispekter. MeCN/0,1% TFA gradiendiga 20-80% MeCN/20 min.

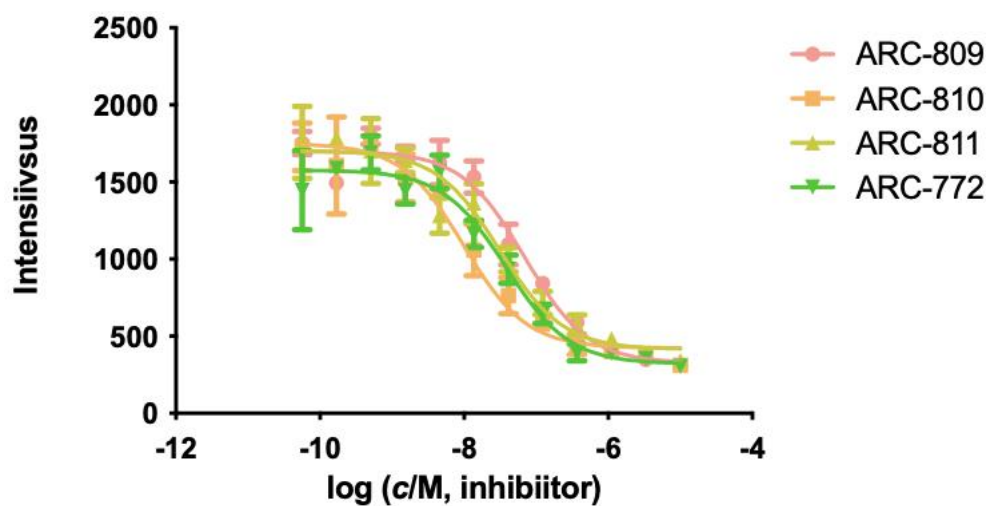


Piikide tabel

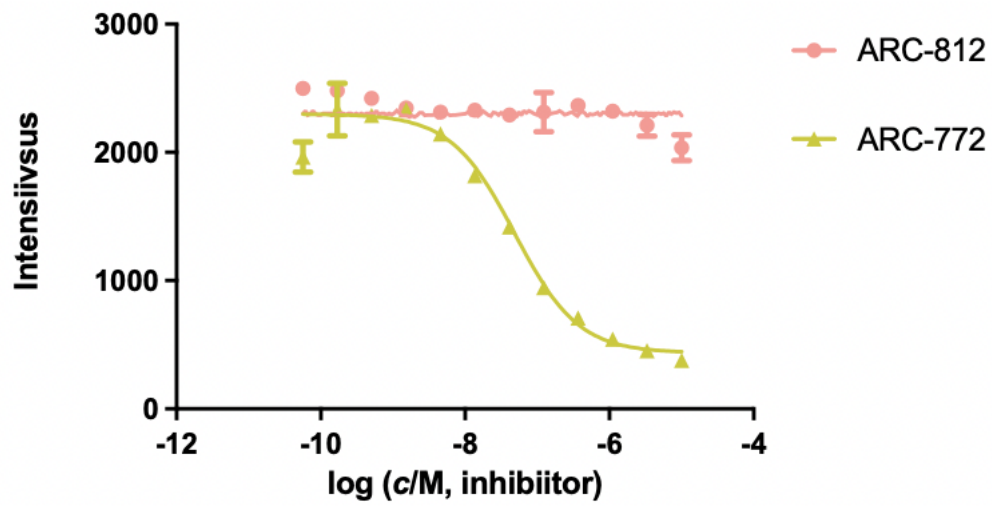
| Peak# | Ret. Time | Area    | Area%   |
|-------|-----------|---------|---------|
| 1     | 3.034     | 4764    | 0.077   |
| 2     | 3.316     | 5234    | 0.084   |
| 3     | 3.604     | 2031    | 0.033   |
| 4     | 3.941     | 125512  | 2.016   |
| 5     | 4.663     | 147055  | 2.362   |
| 6     | 5.312     | 2630    | 0.042   |
| 7     | 5.469     | 31431   | 0.505   |
| 8     | 6.098     | 45485   | 0.731   |
| 9     | 6.459     | 37632   | 0.605   |
| 10    | 6.629     | 20275   | 0.326   |
| 11    | 7.114     | 18464   | 0.297   |
| 12    | 7.694     | 35693   | 0.573   |
| 13    | 8.126     | 12295   | 0.198   |
| 14    | 8.397     | 134138  | 2.155   |
| 15    | 9.001     | 3226    | 0.052   |
| 16    | 10.255    | 12814   | 0.206   |
| 17    | 10.725    | 4552091 | 73.127  |
| 18    | 11.141    | 60945   | 0.979   |
| 19    | 11.483    | 1494    | 0.024   |
| 20    | 11.848    | 672085  | 10.797  |
| 21    | 12.128    | 2214    | 0.036   |
| 22    | 12.438    | 20417   | 0.328   |
| 23    | 12.755    | 37552   | 0.603   |
| 24    | 13.715    | 178104  | 2.861   |
| 25    | 14.132    | 45307   | 0.728   |
| 26    | 14.633    | 1442    | 0.023   |
| 27    | 15.369    | 7880    | 0.127   |
| 28    | 15.755    | 1783    | 0.029   |
| 29    | 15.941    | 3342    | 0.054   |
| 30    | 22.055    | 1594    | 0.026   |
| Total |           | 6224931 | 100.000 |



**Lisa 15.** ARC-813 – ARC-815, ühend 6 väljatõrjumiskõverad. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.



**Lisa 16.** ARC-809 – ARC-811 väljatõrjumiskõverad. Konkureerivaks inhibiitoriks ARC-784.



Lisa 17. ARC-812 väljatõrjumiskõver. Konkureeriv inhibiitor ARC-784.

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

Mina, Kaijus Janis,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Proteiinkinaasi CK2 bisubstraatse inhibiitori ARC-772 struktuuri varieerimine“,

mille juhendaja on Kaido Viht,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **30.05.2025** 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.

*Kaijus Janis*

**25.05.2022**