

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Mihkel Vaher
Epidermaalse kasvufaktori retseptori (EGFR) bisubstraatsete sondide
arendus
Bakalaureusetöö (9 EAP)

Juhendaja: Erki Enkvist, PhD

Tartu 2025

Infoleht

Development of bisubstrate probes for the epidermal growth factor receptor (EGFR)

P310

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a tyrosine kinase that is essential for proper skin cell function and growth. Its overexpression and mutations have been linked with several types of carcinomas. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are one of the options for EGFR related cancer treatment. Luminescent probes can be used to characterize the binding affinity of new drug candidates and to quantify the amount of EGFR units in cell lysates.

The aim of this study was to synthesise potential luminescence ligands for EGFR and characterize their long lifetime luminescence properties biological samples and in dry polyvinyl alcohol (PVA).

The first ligand showed promising results as a Förster resonance energy transfer (FRET) donor with its excitation and emission maximums at 315 and 525 nm accordingly.

The second synthesised compound consisted of a potential FRET donor, linker, and oligoaspartic acid-lysine(5-TAMRA) conjugate. It showed the presence of FRET but the used luminescent dye 5-TAMRA was not the optimal choice. Its excitation and emission maximums were at 320 and 590 nm accordingly.

Keywords: Epidermal growth factor receptor EGFR probe, FRET, benzothieno[3,2-d]pyrimidine, chemical synthesis

Epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGFR) on naharakkude normaalseks talitluseks vajalik türosiini kinaas. Selle üleekspressiooni ja mutatsioonid on seostatud mitme eri tüüpi kartsinoomiga. Türosiini kinaasi inhibiitorid (TKI) on üheks valikuks EGFR-ga seotud vähiravil. Lumineeruvaid sonde saab kasutada uute ravimikandidaatide ensüümi afiinsuse iseloomustamiseks ja EGFR kvantifitseerimiseks rakulüsaadis.

Selle töö eesmärgiks oli sünteesida kaks uut potentsiaalset EGFR-i lumineerivaid ligandi ning iseloomustada nende pika eluajaga lumineerivaid kuivas polüvinüülalkoholi (PVA) maatriksis.

Esimene ligand näitas potentsiaali Försteri tüüpi energia ülekande (FRET) doonorina ning selle ergastus ja emissioonimaksimumid olid vastavalt 315 ja 525 nm.

Teine sünteesitud aine koosnes potentsiaalsest FRET doonorist, linkerist ja oligoaspargiin-lüsiin(5-TAMRA). Mõõtmistulemus näitas FRET toimumist kuid kasutatud lumineerivvärv

5-TAMRA polnud optimalne valik. Selle ergastus ja emissioonimaksimumid olid vastavalt 320 ja 590 nm.

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	6
1. Sissejuhatus	8
2. Kirjanduse ülevaade	9
2.1. EGFR.....	9
2.2. EGFR inhibiitorid kui vähi sihtmärkravis kasutatavad ravimid.....	9
2.3. Fluorestsents ja fosforestsents	11
2.4. Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne (FRET)	13
2.5. ARC-Lum sondid	13
2.6. Fluorestsentsi anisotroopia	14
2.7. Varasem töö ja käesoleva töö eesmärk	15
3. Eksperimentaalne osa	16
3.1. Materjalid ja meetodid	16
3.2. Süntees 1	18
3.2.1. Aine 1 (p-aminofenool) süntees	18
3.2.2. Aine 2 (5-kloro-N-(4-hüdroksüfenüül)tiofeen-2-karboksamiid) süntees.....	19
3.2.3. Aine 3 (8-bromo-4-kloro[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin) süntees.....	20
3.2.4. Aine 4 (N-{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin-4-ül)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen-2-karboksamiid) süntees.....	20
3.3. süntees 2	21
3.3.1. aine 5 (N ⁴ -(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin-4,8-diamiin) süntees..	21
3.3.2. Aine 6 (metüül 4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-8-ül]amino}heksanoaat) süntees.....	22
3.3.3. Aine 7 (4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-8-ül]amino}heksaanhape) süntees	22
3.3.4. Aine 8 süntees (peptiidi kinnitamine)	23
3.3.5. Peptiidi eemaldamine 2-CTC vaigult.....	24
3.3.6. Aine 9 süntees (5-TAMRA kinnitamine)	24

4.	Mõõtmised.....	25
4.1.	Ainete 2 ja 4 luminestsents-omadused	25
4.2.	Aine 7 kõrvalprodukti analüüs	26
4.3.	ARC-2302 ja ARC-2303 fosforestsentsispektrid	26
5.	Tulemused ja arutelu	27
5.1.	Esimene süntees	27
5.2.	Teine süntees	29
6.	Kokkuvõte	33
7.	Kasutatud kirjandus.....	34
8.	Lisad	36
9.	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	48

Kasutatud lühendid

2CTC – 2-klorotritüül kloriid

5-TAMRA – 5-karboksütetrametüülrodamiin

ARC - adenosiini-analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ARC-Lum - luminesceeruv adenosiini-analoogi ja oligoarginiini konjugaat

Asp – aspargiinhape

ATP – adenosiintrifosfaat

Boc – tert-butoksükarbonüül

D - aspargiinhape

DiPEA – diisopropüül-etüül-amiin

DMF – dimetüül formamiid

EA – etüülatsetaat

EGF – epidermaalne kasvufaktor (*epidermal growth factor*)

EGFR - epidermaalse kasvufaktori retseptor (*epidermal growth factor receptor*)

ErbB - erütroblastilise leukeemia viiruse onkogeen (*erythroblastic leukemia viral oncogene*)

EtOAc - etüülatsetaat

EtOH – etanool

Fmoc – fluorenüül-metoksükarbonüül

FRET – Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne (*Förster-resonance energy transfer*)

HBTU – heksafluorofosfaat bensotriasool tetrametüül uronium

HOBT - hüdroksübensotriasool

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

IC50 – inhibiitori kontsentratsioon, mille juures ensüümi aktiivus väheneb 50%

ISC – süsteemisene üleminek (*intersystem crossing*)

K - lüsiin

Lys - lüsiin

m/z – massi-laengu suhe

MeOH – metanool

MS – massispektromeeter

NMM – N-metüül morfoliin

NSCLC – mitte-väikerakk kopsuvähk (*non-small-cell lung cancer*)

PDA – fotodiodrivi detektor (photodiode array)

PFS – progressioonivaba elulemus (*progression free survival*)

PNP – p-nitrofenool

PVA – polü(vinüül alkohol)

RTP – toatemperatuuril toimuv fosforesents (*room-temperature phosphorescence*)

TAMRA-NHS – 5-karboksütetrametüülrodamiin-suksiinimiid ester

TEA - trietüülamiin

TiPS – triisopropüül silaan

TKI – türosiini kinaasi inhibiitor

TLC – õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*)

wt – muteerumata EGFR (*wild type*)

1. Sissejuhatus

Proteiinkinaasid on ensüümid, mille funktsiooniks on ATP-lt fosforüülrühma üleviimine kindlale aminohappejäägile substraatvalgus. Seda protsessi nimetatakse fosforüülimiseks. Epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGFR) on transmembraanne retseptor, mis koosneb rakuvälisest retseptori domeenist ja rakusisese kinaasidomeenist, millele keskendutakse selles töös. EGFR kuulub türosiini kinaaside ErbB perekonda ning osaleb epiteelkoe rakkude jaoks tähtsates funktsioonides, näiteks jagunemisel, diferentseerumisel ja liikumisel (Şandor *et al.*, 2023). EGFR-i üleekspressiooni ja mutatsioone on seostatud paljude eri tüüpi kartsinoomide ehk epiteelkoe vähkkasvajate arenguga ning seetõttu leiab see kasutust vähiravimite sihtmärgina. (Shaban *et al.*, 2023; Shin *et al.*, 2014).

EGFRile on leitud ootamatuid funktsioone metabolismi ja autofaagia reguleerimises keskkonna- või rakusisese stressi avaldudes. Need rajad on vähkkasvajates sageli aktiveeritud, andes eelise proliferatsioonis võrreldes normaalsete rakkudega ning see tõstab ravile resistentsete mutatsioonide tekke tõenäosust (Sigismund *et al.*, 2018).

EGFRi liigaktiivsusest põhjustavad kasvaja sihtmärkraviks kasutatakse nii retseptori- kui kinaasidomeeniga interakteeruvaid inhibiitoreid, millest viimased on madalmolekulaarsed ning nende baasil saaks arendada fosforestseeruvaid sonde. Potentsiaalsete ravimikandidaatide iseloomustamiseks kasutatakse sidumiskatseid, milles võrreldakse molekulaarsondi ja sellega konkurentse inhibiitori seondumist vastava kinaasiga (Manoharan *et al.*, 2015; Shaban *et al.*, 2023). Fosforestreeruv sond sobiks sellisteks katseteks hästi ning lisaks võimaldaks see ka EGFR-i kontsentratsiooni määramist bioloogilistes proovides.

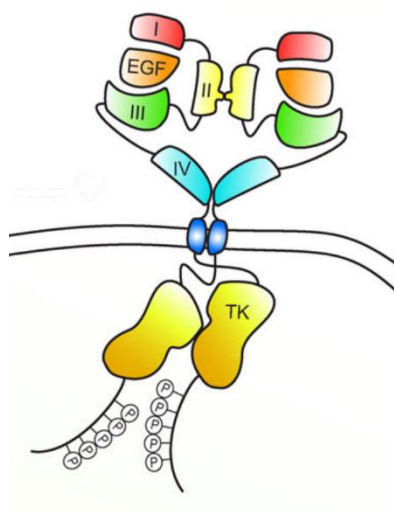
Varem uuritud N^4 -(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-*d*]püridimiin-4,7-diamiin ja N^4 -(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-*d*]püridimiin-4,8-diamiin omavad madalat IC_{50} väärtust (vastavalt 0,27 ja 0,47 nM) ning on potentsiaalselt Försteri tüüpi resonantse energia ülekande (FRET) doonorid tiofeeni fragmendi tõttu (Enkvist *et al.*, 2011; Showalter *et al.*, 1999). Selle töö eesmärgiks on sünteesida varem uuritud [1]bensotieno[3,2-*d*]pürimidiin-4-amiin fragmenti sisaldavaid potentsiaalselt luminesceerivaid EGFR ligande ning uurida nende fotoomadusi.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. EGFR

EGFR on türosiini kinaaside perekonda (ErbB) kuuluv ensüüm, mis mängib olulist rolli epiteelkoe rakkude elutsüklis. Happelembelise kinaasina fosforüleerib see negatiivselt laetud peptiidijärjestusi (Sugiyama et al., 2019).

Tavaolekus eksisteerib EGFR rakumembraanil monomeerina. Ligandi, ehk epidermaalse kasvufaktoriga (EGF) seondumine viib rakuvälises osas läbi konformatsioonilise muutuse, mis soodustab retseptori dimeeri teket ja peegeldub katalüütilises domeenis asümmeetrilise dimeeri tekkena (Joonis 1). Varem arvati, et kinaasi aktiivse vormi moodustamiseks on vajalik katalüütiliste domeenide transfosforüülimine aktivatsiooniaasas, kuid kristallograafilise analüüsi põhjal avastati, et interaktsioon toimub hoopis allosteeriliselt ühe kinaasi N-terminaalse ja teise C-terminaalse otsa vahel (Kovacs et al., 2015; Sigismund et al., 2018).

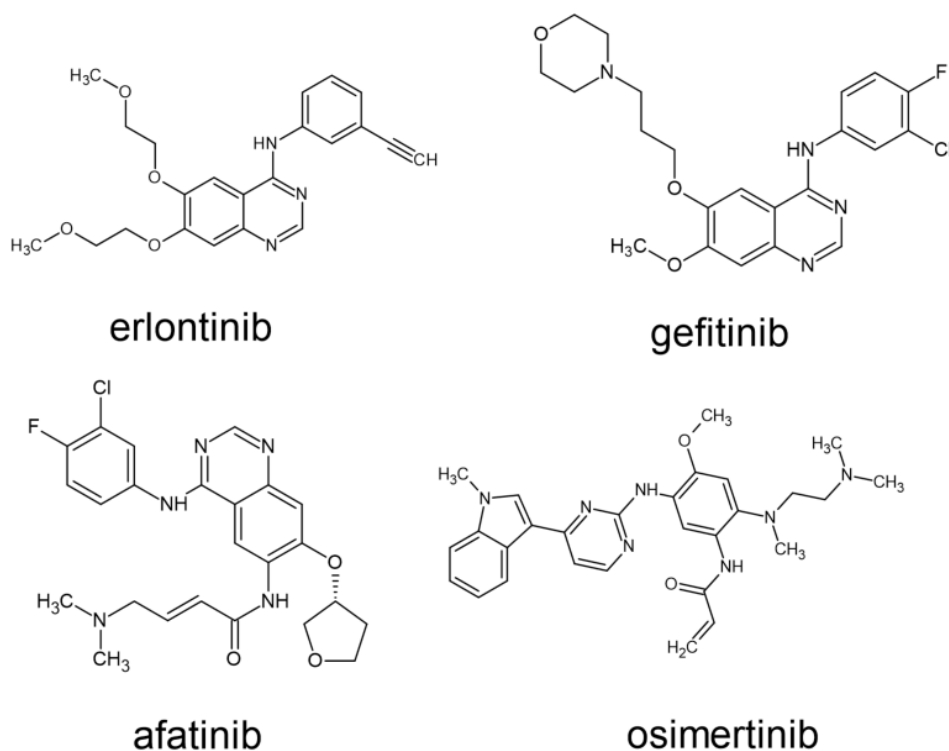


Joonis 1 Epidermaalse kasvufaktori retseptori rakuväline (üleval) ja kinaasi (all) domeen. EGF - Epidermaalne kasvufaktor; I-IV rakuvälised domeenid; TK - türosiini kinaas; P – fosforüülrühm (Sigismund et al., 2018)

2.2. EGFR inhibiitorid kui vähi sihtmärkravis kasutatavad ravimid

EGFR-i inhibeervad ravimid jagunevad kahte klassi: 1) monokloonsed antikehad (mAbs), mis seonduvad retseptori rakuvälise osaga ning takistavad selle dimeriseerumist, ja 2) türosiini kinaasi inhibiitorid (TKI), mis seonduvad kinaasi ATP taskuga ning takistavad fosforüülimise toimumist. Kinasoliinil põhinevate molekulide seondumisvõime avastamine viis

esimese generatsiooni EGFR-i mõjutavate ravimite väljatöötamiseni (Joonis 2), mille ensüümi aktiivsust 50% vähendava aine kontsentratsioon, ehk IC_{50} , on gefitinibil 17,45 nM ja erlotinibil 13,55 nM muteerumata ensüümiga ($IC_{50_{wt}}$). Esimese generatsiooni kliiniliste saavutustega kaasnesid samas uued, ravile resistentsed mutatsioonid nagu näiteks T790M, milles treoniini jääk valgu järjestuses 790. positsioonil on asendatud metioniini jäägiga, langetades erlotinibi afiinsust oluliselt. (Shaban et al., 2023; Todsaporn et al., 2022).

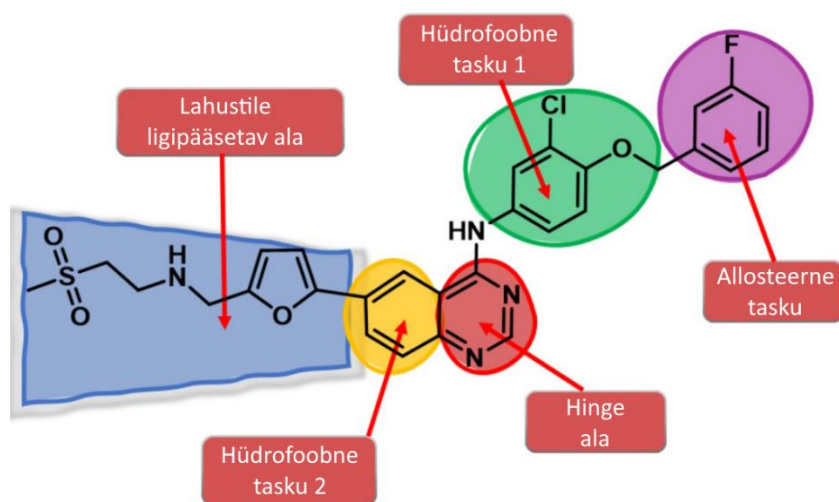


Joonis 2 EGFR inhibiitorite erlotinib (I), gefitinib (I), afatinib (II) ja osimertinib (III generatsioon) struktuurid

Teise generatsiooni ravimid inhibeerivad ka teisi ErbB perekonna kinaase või seonduvad ensüümis kovalentselt C797 jäägiga, takistades rakusiseste EGFR signaalide levikut. Afatinib (Joonis 2) ($IC_{50_{wt}} = 49$ nM; $IC_{50_{L858R/T790M}} = 14$ nM), mis võeti kasutusele aastal 2013, oli NSCLC raviks efektiivsem kui eelmise generatsiooni ravimid. Selle struktuuri on kaasatud α , β küllastumata ketoon, mis reageerib EGFR 797. positsioonil asuva tsüsteiini jäägiga, moodustades kovalentse sideme ning inhibeerides kinaasi pöördumatult. (Shaban et al., 2023; Todsaporn et al., 2022)

Kolmanda generatsiooni ravimid, sarnaselt teistega, seonduvad kinaasiga kovalentselt ja pöördumatult. Osimertinib (Joonis 2) ($IC_{50_{wt}} = 366$ nM; $IC_{50_{L858R/T790M}} = 12$ nM; $IC_{50_{L858R/T790M/C797S}} = 8$ nM) on EGFR-aktiveerivatele ja sekundaarsele T790M mutatsioonile selektiivne pöördumatu TKI, mis algselt andis kliiniliselt positiivseid tulemusi, kuid nagu

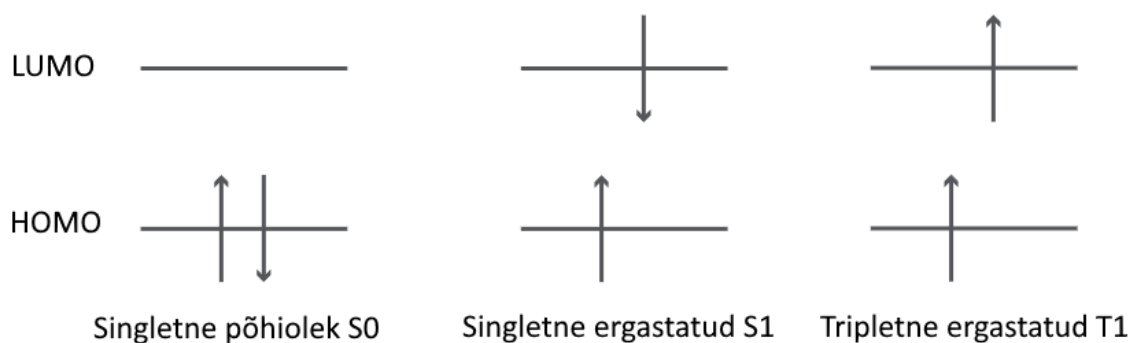
varem, viis see lõpuks uute resistentsete mutatsioonideni nagu C797S ning vahel ka T790M mutatsiooni kadumiseni. Neljas generatsioon on hetkel välja töötamisel ning nende eesmärk on takistada edasiste resistentsete mutatsioonide teket, seondudes EGFR allosteerse taskuga (Joonis 3) (Shaban et al., 2023; Todsaporn et al., 2022).



Joonis 3 EGFR kinaasi ATP tasku regioonid võrdluses lapatinibi (I generatsioon) struktuuriga (Şandor et al., 2023)

2.3. Fluorestsents ja fosforestsents

Orgaanilise konjugeeritud süsteemi ergastamisel võib elektron minna põhiolekust (S_0) ergastatud singletsesse olekusse S_1 . Nähtust, kus $S_1 \rightarrow S_0$ üleminekul eraldub foton, nimetatakse fluorestsentsiks. Lisaks läheb osa elektrone S_1 -st madalaima energiaga tripletsesse olekusse T_1 , mida nimetatakse süsteemidevaheliseks üleminekuks (ISC). Elektroni relakseerumisel $T_1 \rightarrow S_0$ eraldub foton ning seda nähtust nimetatakse fosforestsentsiks. See toimub mitu suurusjärku aeglasemalt kui fluorestsents, sest tegemist on keelatud üleminekuga (Joonis 4). Relakseerumisel eralduv valgus on madalama energiaga kui neeldunud valgus, kuna siseülekandel esinevad kaod, mille tulemusel helendavad UV-valgusega ergastatud fosforestseeruvad ained nähtavas spektris (Kuijt et al., 2003).



Joonis 4 Tripletne olek

Fosforestseeruvate omaduste parandamiseks saab 1) tõsta ISC kvantsaagist ja 2) vähendada energiakadusid mittekiirguslikest protsessidest. ISC kvantsaagis suureneb, kui süsteemi kaasata raskeid aatomeid nagu broom, väävel ja seleen. Fosforestsentsi eluiga τ_p aromaateses süsteemides väheneb hapniku juuresolekul, põrkumisel ümbritseva keskkonnaga ning kovalentsete sidemete pöörlemisel, mistõttu on kasulik disainida molekule, milles on selliseid sidemeid vähe. (Hirata, 2017).

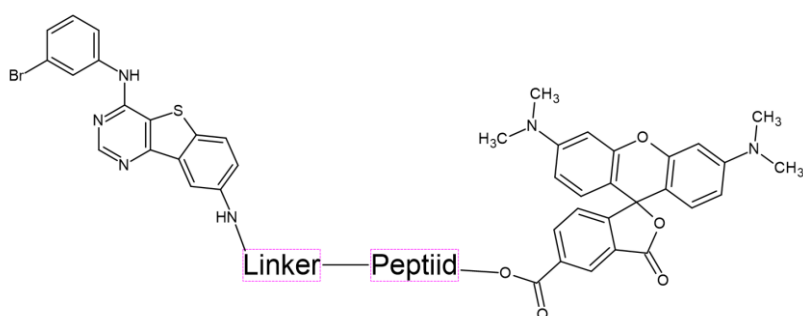
2.4. Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne (FRET)

Försteri tüüpi resonantne energia ülekanne (FRET) on mittekiirguslik energia ülekanne kahe ruumis eraldi paikneva luminofoori vahel, mida nimetatakse doonoriks ja aktseptoriks. Energia ülekande kiiruskonstant k_T avaldub valemiga (1), kus k_D on ergastatud doonori emissioonikonstant ülekande puudumisel ning r on doonori ja aktseptori vaheline distant. R_0 ehk Försteri raadius on kriitiline vahekaugus paari vahel millest kaugemal on doonori kiire kustumine tõenäolisem kui FRET toimumine. Lisaks on oluline, et doonori emissioonispekter kattuks aktseptori neeldumisspektriga.

$$(k_T = k_D \left(\frac{R_0}{r}\right)^6) \quad (1)$$

2.5. ARC-Lum sondid

Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisgrupis on varem uuritud selenofeeni ja tiofeeni fragmenti sisaldavaid väikemolekul ARC-tüüpi luminesceeruvaid sonde. Kui tavaliselt toimub FRET paari vahel energia ülekanne kahe singletse oleku vahel (SS-FRET), siis ARC-Lum sondides esineb aeglasem triplet-singlett (TS-FRET). Sellises süsteemis on doonoriks tio- või selenofeeni fragment ning aktseptoriks peptiidiga ühendatud fluorestsceeruv värv (Joonis 5). TS-FRET-i toimumise kiirus on palju suurem kui doonori fosforescents, kuna see annab tripletsele olekule soodsama energia ära andmise kanali.



Joonis 5 ARC-2303 lihtsustatud struktuur, kus linker on heksaanhape, luminesceeruv värv on 5-TAMRA ning peptiid kooneb L-aspargiinhappe ja L-lüsiini jääkidest

Doonori ergastatud oleku kustumise tõenäosus väheneb, kui see on ensüümiga seondunud ning vee ja hapniku eest kaitstud. Fosforescentsi intensiivsuse korrelatsiooni seondunud ligandi hulgaga saab kasutada inhibiitori seonduvuse määramiseks uuritava valgu suhtes. Kuna fosforescentsiga kaasneb süsteemides ka fluorestsents, on kasulik disainida pikema eluajaga

sonde ning viia mõõtmine läbi viivitusega (50-100 μ s) pärast ergastamist. Nii saab kõrvaldada müra ergastavast valgusest, sondi fluorestsentsist ning rakkude autofluorestseerumisest. (Braslavsky, 2007; Enkvist et al., 2011).

2.6. Fluorestsentsi anisotroopia

Fluorestsentsi anisotroopia karakteriseerib kiirgunud valguse polarisatsiooni ning see on defineeritud valemiga (2), kus $I_{\parallel}$ ja $I_{\perp}$ on läbi polariseeritud filtri mõõdetud emissiooni intensiivsused vastavalt kollineaarselt ja risti ergastava valguse polarisatsiooniga. Kui molekul on ergastus- ja emissiooni hetkedel orienteerunud ruumiliselt samas suunas, on kiirgunud kvandi polarisatsiooni tasand sama neeldunud kvandi omaga. Fluorestsentsi anisotroopia võimaldab kvantifitseerida uuritava luminofoori seondumist valguga, kuna viimane aeglustab luminofoori pöörlemist ruumis. See tähendab, et suurem anisotroopia vastab tugevamale luminofoori seondumisele valguga. (Braslavsky, 2007)

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

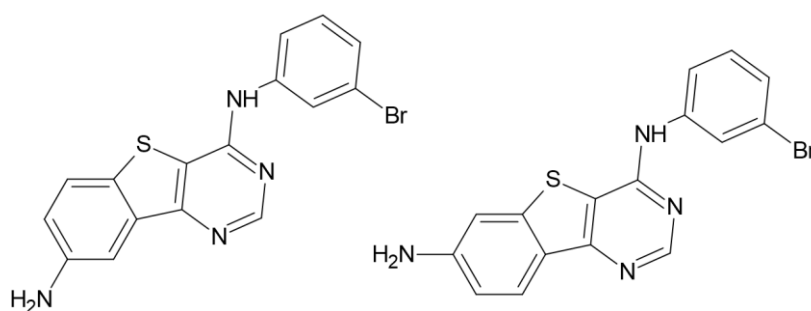
2.7. Varasem töö ja käesoleva töö eesmärk

Varem on Tartu Ülikoolis arendatud pika eluajaga luminescents-märgistatud bisubstraatseid oligoaspargiinhapet sisaldavaid inhibiitoreid kaseiinkinaas 2-le (CK2), mis on samuti happelembeline, kuid erinevalt EGFR-ist mitte türosiini, vaid seriini/treoniini kinaas (Vahter et al., 2018).

Teised uurimisrühmad on sünteesinud ja iseloomustanud bisubstraatseid EGFR inhibiitoreid, mis koosnesid gefitinibi analoogist ning LARLLT peptiidist, mis kujutab endast alifaatsete naabritega ümbritsetud positiivse laenguga arginiini jääki (Tan et al., 2023).

Seni pole kirjendatud negatiivselt laetud peptiidiga bisubstraatset EGFR sondi, millel esineb TS-FRET. Varem uuritud türosiini kinaasi inhibiitoritest valiti algstruktuuriks broomi ja väävlit sisaldav hästiseonduv ($IC_{50_{wt}} = 0,27 \text{ nM}$) aine. *N*⁴-(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-*d*]pürimidiin-4,8-diamiin sünteesil tekivad nii 7- kui 8- amino asendatud produktid, mis mõlemad näitasid head seonduvust kinaasiga (Joonis 6) (Showalter et al., 1999).

Selles töös esimene sünteesitud aine on algstruktuuri modifikatsioon, milles asendati 3-bromoaniliin 4-hüdoksüaniliini fragmendiga. Selle külge lisati täiendav 5-kloro-tiofeen-2-karboksamiidi fragment (Joonis 10), mis paikneb kinaasi allosteerilises taskus ning võib võimendada esimese FRET doonori signaali. Teine valmistatud aine on bisubstraatne inhibiitor, mis lisab algstruktuurile linkeri, peptiidahela ning FRET aktseptorina käituvat fluorestseeruva värvi 5-TAMRA.



Joonis 6 *N*⁴-(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-*d*]püridimiin-4,*x*-diamiin (aine 5) 7- ja 8- amino asendatud isomeerid, kus *x*=7 või 8

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Materjalid ja meetodid

HPLC (kõrgefektiivne vedelikkromatograafia) analüüsil kasutati eluendina vett (A) ja atseetonitritiili (B), mille gradient on toodud Lisa 1. Kasutatud reagensid, lahustid ja soolad on toodud tabelis (Tabel 1). Kasutatud masinad ja tarvikud on toodud tabelis (Tabel 2). MS-i kromatogrammid mõõdeti positiivse ionisatsiooni režiimis.

Tabel 1 Kasutatud reagensid

aine	CAS	tootja / sünteesinud	puhtus
etüülatsetaat	141-78-6	Lach-Ner	
heksaan	110-54-3	Honeywell	97%
kloroform	67-66-3	Fisher	99,80%
etanool	64-17-5		
metanool	67-56-1		
isopropanool	67-63-0		
diklorometaan	75-09-2		
SiO ₂ (slikageel)	7631-86-9	Fluorochem	60A 40-63u
DMSO-d ₆	2206-27-1	Deutero	99,8% + 0,03% TMS
kloroform-d ₁	865-49-6	Deutero	99,8% + 0,03% TMS + Ag
NaOH	1310-73-2		
NaCl	7647-14-5	biotop, naxo	
Na ₂ SO ₄	7757-82-6	Lach-Ner	
K ₂ CO ₃	584-08-7	Lach-Ner	
NaHCO ₃	144-55-8	Sigma-Aldrich	
SnCl ₂ ·2H ₂ O	10025-69-1		
KHSO ₄	7646-93-7	ROTH	
TFA	76-05-1	Fisher	99,50%
TiPS	6485-79-6	Sigma-Aldrich	99%
DMF	68-12-2		
NMM	109-02-4	Fluka	98%
TEA	121-44-8	Fisher	99,50%
DiPEA	7087-68-5	ROTH	suurem kui 99%
piperidiin	110-89-4		
PVA (Mowiol® 20-98)	9002-89-5	Sigma-Aldrich	
POCl ₃	10025-87-3	Fluka	98%
metüül-6-bromo-heksanaat	14273-90-6	Fluorochem	

p-nitrofenool	100-02-7		
TAMRA-NHS	150810-69-8		
5-kloro-tiofeen-2-karboksüülhape	24065-33-6	ABCR	
HOBt	2592-95-2		
HBTU	94790-37-1		
3B lüüsiühver		Kaido Viht	
Fmoc-[L-Asp(tBu)]5-[L-Lys(Boc)]-O-2CTC		Kaido Viht	
8-bromo-4-kloro[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin		Erki Enkvist	
HeLa rakud		Darja Lavõgina (American Type Culture Collection)	

Tabel 2 Kasutatud masinad ja tarvikud

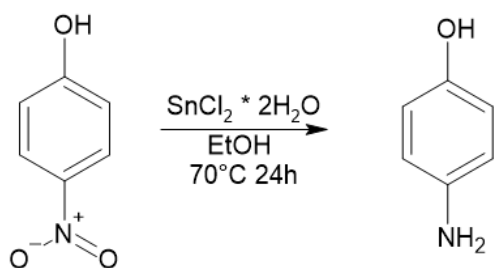
nimi	tootja	otstarve
NEO HTS	Synergy™ NEO	mikroplaadi lugeja
PheraStar	BMG Labtech	mikroplaadi lugeja
FP 607B (540-20 590-20 590-20) moodul	BMG Labtech	fluorestsentsi anisotroopia
THERMOstar	BMG Labtech	soojendusega loksuti
4514 (384-well Low Volume Black Round Bottom)	Corning	mikroplaat
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific	UV-Vis spektrofotomeeter
Avance III HD 700 MHz	Brucker	1H NMR
Rotavapor R-200	Büch	kõrgvaakum kuivati
RVC 2-25 CDplus	Christ	vaakum tsentrifuug
Gemini 5 µm C18 110 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea	Phenomenex	HPLC põhikolonn
Kinetex 5 µm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea	Phenomenex	HPLC eelkolonn
LC-20AD	Shimadzu	HPLC eluendi pump
CTO-20A	Shimadzu	HPLC kolonni ahi
DGU-20A	Shimadzu	HPLC degaseerimise süsteem
ESI-LC/LCMS-2020 single Quadrupole	Shimadzu	massispektromeeter
SPD-M20A	Shimadzu	HPLC dioddrivi detektor

Tabel 3 kasutatud ja sünteesitud ainete nummerdus

Aine nr	IUPAC nimetus või struktuuri viide
1	4-aminofenool
2	5-kloro- <i>N</i> -(4-hüdroksüfenüül)tiofeen-2-karboksamiid
3	8-bromo-4-kloro[1]bensotieno[3,2- <i>d</i>]pürimidiin
4	<i>N</i> -{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2- <i>d</i>]pürimidiin-4-yl)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen-2-karboksamiid
5	<i>N</i> ⁴ -(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2- <i>d</i>]pürimidiin-4,8-diamiin
6	Metüül 4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2- <i>d</i>]pürimidiin-8-üül]amino} heksanoaat
7	4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2- <i>d</i>]pürimidiin-8-üül]amino} heksaanhape
8a	Lisa 2
9a	Lisa 3

3.2. Süntees 1

3.2.1. Aine 1 (*p*-aminofenool) süntees



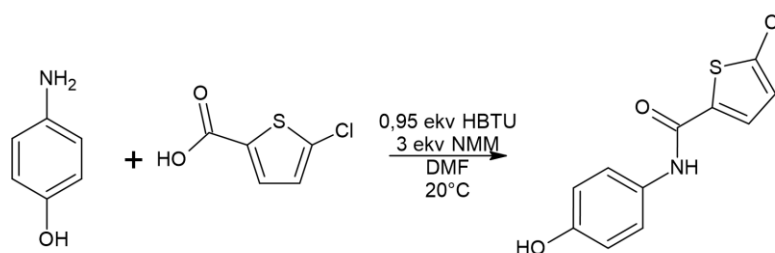
Joonis 7 aine 1 sünteesiskeem

25 ml ümarkolbi kaaluti 238 mg *p*-nitrofenooli (PNP) ja 236 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ning lisati 3 ml etanooli. Lisati segamispulk, kolvile kinnitati septum, ümbritseti see fooliumseelikuga, ning reaktsioon käivitati 70 °C juures koos segamisega aeglases N_2 läbivoolus. Reaktsiooni monitooriti TLC abil (eluent 1:3 heksaan, etüülatsetaat), lisati 1,42 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 ml etanooli ning jäeti reaktsioon üleöö käima.

Võeti proov reaktsioonisegust, millele lisati 200 µl etüülatsetaati (EtOAc) ja pipetiga 2 tilka 5% NaHCO₃ lahust. Viidi läbi TLC sama eluendiga võrdluses algaine p-nitrofenooliga (Lisa 4).

Edasine töö viidi läbi punase lambi all, kuna produkt on valgusetundlik. Kolvil lasti jahtuda toatemperatuurile, kallati selle sisu jää-vee segule ning segati. pH viidi ligikaudu 7-ni 5% NaHCO₃ lisamisega. Toorsegu ekstraheeriti 3 korda etüülatsetaadiga. Saadud orgaanilist faasi ekstraheeriti 1 kord küllastunud NaCl lahusega, kuivatati veevaba Na₂SO₄-ga ning lahusti eemaldati rotaatoraurustil. Saadi 119 mg ainet, millele vastab saagis 64%. Kolb täideti inertgaasiga, korgi ümber mässiti parafiinkile, kolv kaeti tihedalt fooliumiga ning seda säilitati külmkapis.

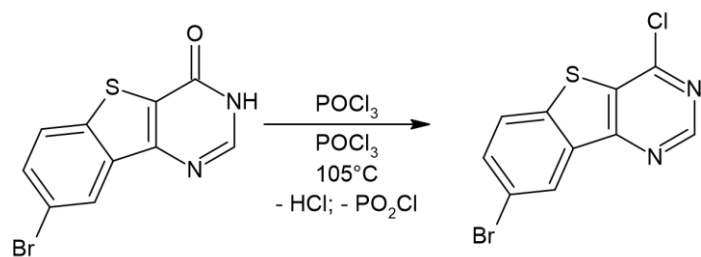
3.2.2. Aine 2 (5-kloro-N-(4-hüdroksüfenüül)tiofeen-2-karboksamiid) süntees



Joonis 8 aine 2 sünteesiskeem

50 ml ümarkolbi lisati 119 mg (1,1 mmol) p-aminofenooli (PAP) ning see lahustati 1 ml dimetüülformamiidis (DMF). 25 ml ümarkolbi lisati 176 mg 5-kloro-tiofeen-2-karboksüülhapet, 2 ml DMF, 393 mg HBTU-d ning segati magnetpulgaga 5 min. Seejärel lisati karboksüülhappe-HBTU segu esimesse kolbi. Reaktsiooni kulgemist kontrolliti 1 h pärast TLC-ga ning määrati lõppenuks 2 h pärast algust (Lisa 5). Suurem osa DMF-i eemaldati rotaatoraurustil, lisati väike kogus etüülatsetaati ning ekstraheeriti 3 korda 5% NaHCO₃ ja 3 korda 1 M KHSO₄ lahustega, säilitati orgaaniline faas. Edasised etapid teostati analoogselt alapeatükis 3.2.1 kirjeldatuga. Saadi 283 mg ainet, saagisega 107%. Produkti analüüsiti ¹H NMR meetodil (Lisa 6).

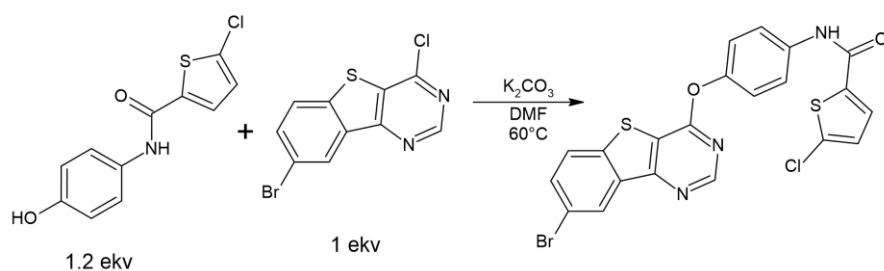
3.2.3. Aine 3 (8-bromo-4-kloro[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin) süntees



Joonis 9 aine 3 sünteesiskeem

10 ml ümarkolbi kaaluti 25 mg algainet ning lisati 6 ml POCl₃. Reaktsioonisegu kuumutati tagasijooksul 105 °C juures õhkjahutiga 3 päeva. Suurem osa POCl₃ eemaldati rotaatoraurustil, lisati paar ml etüülatsetaati (EtOAc) ja vett ning segu loputati 100 ml jaotuslehtrisse. Lisati väikeste portsudena 5% NaHCO₃ lahust ning loksutati püstist ilma korgita jaotuslehtrit õrnalt kuni mullitamine vaibus. Lisati EtOAc kuni kogu sade oli lahustunud ning orgaaniline faas eraldati. Vesifaasi ekstraheeriti veel EtOAc-ga ning orgaanilised faasid kombineeriti. Edasised etapid teostati analoogselt alapeatükis 3.2.1 kirjeldatuga. Saadi 21 mg ainet saagisega 79%.

3.2.4. Aine 4 (N-{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin-4-üül)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen-2-karboksamiid) süntees



Joonis 10 aine 4 sünteesiskeem

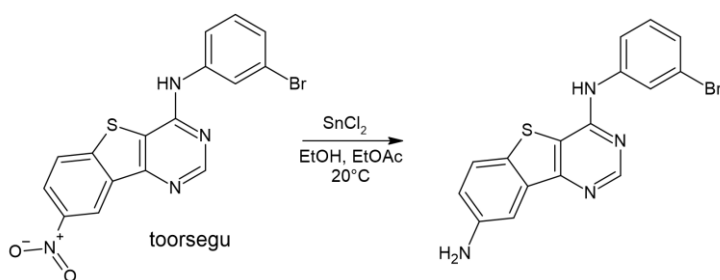
Alapeatükis 3.2.2 sünteesitud 5-kloro-N-(4-hüdroksüfenüül)tiofeen-2-karboksamiid (aine 2) ning Erki Enkvist-i sünteesitud aine 3 lahustati 2 ml DMF-is ning lisati 13 mg K₂CO₃, mis lahustus vähesel määral. Karbonaadi roll selles reaktsioonis on fenolaadi tekitamine ja reaktsiooni käigus tekkinud HCl neutraliseerimine. Reaktsiooni käiku monitooriti TLC abil (Lisa 7) ning järgmisel päeval lisati 22 g ainet 2 ja 31 mg K₂CO₃.

Reaktsioonisegul lasti jahtuda toatemperatuurile, lisati paar ml kloroformi ning viidi üle lihviga katseklaasi. Alumist kloroformi kihti ekstraheeriti 1 M K₂CO₃ lahusega. Lisati 12 ml kloroformi. Jätkati ekstraheerimist karbonaadi lahusega kuni veekiht kaotas kollaka värvuse

ning seejärel 3 korda destilleeritud veega. Orgaaniline faas koguti kokku, tsentrifuugiti 2 min 4900 rpm. Kloroform eraldati sademest ning edasised etapid teostati analoogselt alapeatükis 3.2.1 kirjeldatuga. Toorsegu massiks määrati 18 mg (saagis 107%).

3.3. süntees 2

3.3.1. aine 5 (*N*⁴-(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3,2-*d*]püridiini-4,8-diamiin) süntees

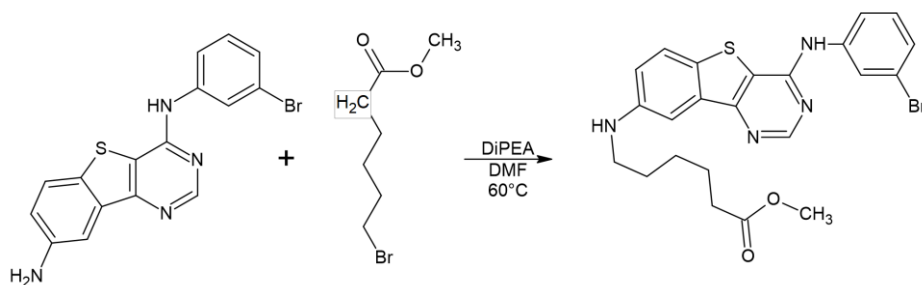


Joonis 11 aine 5 sünteesiskeem

Ümarkolvis määrati laboris varem sünteesitud aine toorsegu massiks 226 mg. Sellele lisati 5 ml etanooli (EtOH) ja 850 μl EtOAc. Segati magnetsegajal kuni kõik oli lahustunud. Lisati 400 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ning kolb kaeti fooliumiga. 3 päeva pärast eemaldati lahusti rotaatoraurustil. Reaktsioonisegule lisati 20 ml EtOAc ja 5% NaHCO_3 , viidi üle 100 ml koonuskolbi ning lisati veel NaHCO_3 lahust kuni mullitamine lakkas. Ekstraheeriti 4 korda EtOAc-ga, kogudes pipetiga pindmine vedel kiht. Vedel vesifaas eraldati, ekstraheeriti 1 kord EtOAc-ga ning orgaanilised faasid kombineeriti. TLC analüüsil (eluent 20:1 kloroformi ja metanooli segu) saadi produkti $R_f=0,18$ (Lisa 8). HPLC-MS analüüsi abil tuvastati produkti kaks isomeeri (Lisa 9).

Toorprodukti puhastati kolonnkromatograafiliselt, kus kasutati sama sama eluenti kui TLC-s. Koguti 50 ml esimest faasi ning seejärel 17 5-10 ml fraktsiooni, mida analüüsiti TLC-ga võrdluses toorsegu prooviga kasutades eluendina 10:1 kloroformi ja metanooli segu. Fraktsioonid 4-13 ja 14-17 kombineeriti ning lahusti eemaldati. Saadi 71 mg produkti, mis vastab saagisele 34%.

3.3.2. Aine 6 (metüül 4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-8-üül]amino}heksanoaat) süntees

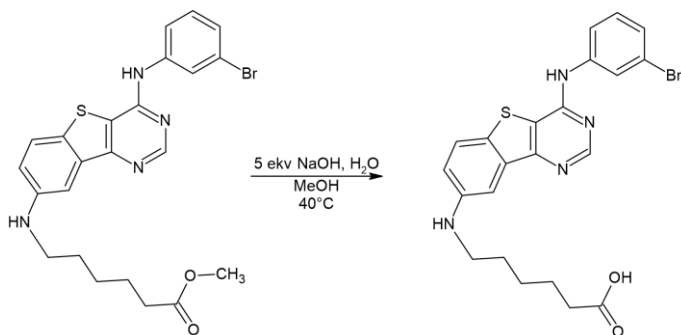


Joonis 12 aine 6 sünteesiskeem

64 mg ainet 6 lahustati 400 µl DMF-is. Lisati 89 µl DiPEA (3 ekv) ja 36 µl (1,3 ekv) metüül-6-bromo-heksanaati. Reaktsioon peatati paari päeva pärast ning selle käiku kontrolliti TLC abil kasutades eluendina 15:1 kloroformi ja metanooli segu +1% DiPEA (Lisa 10). Toor segu viidi jaotuslehtrisse ning reaktsioonianumat loputati EA ja 5% NaHCO₃ lahusega. Orgaanilist faasi pesti 2 korda vesinikkarabonaadiga ning vesifaasi 1 kord värsketüülatsetaadiga. Orgaanilised faasid kombineeriti ning lahusti eemaldati sarnaselt peatükis 3.2.1 kirjeldatuga.

Produkt puhastati kolonnkromatograafiliselt 10 g silikageeliga 12 cm kolonnis ning koguti 3-5 ml fraktsioone. UV-aktiivseid fraktsioone võrreldi toosegu ja reaktsiooni jälgimise käigus tehtud TLC-ga. Mono- ja di-asendatud produktid asusid vähese lahutusega fraktsioonides 7-9 (Lisa 11), mis kombineeriti ning lahusti eemaldati.

3.3.3. Aine 7 (4-{[4-(3-bromoanilino)[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-8-üül]amino}heksaanhape) süntees

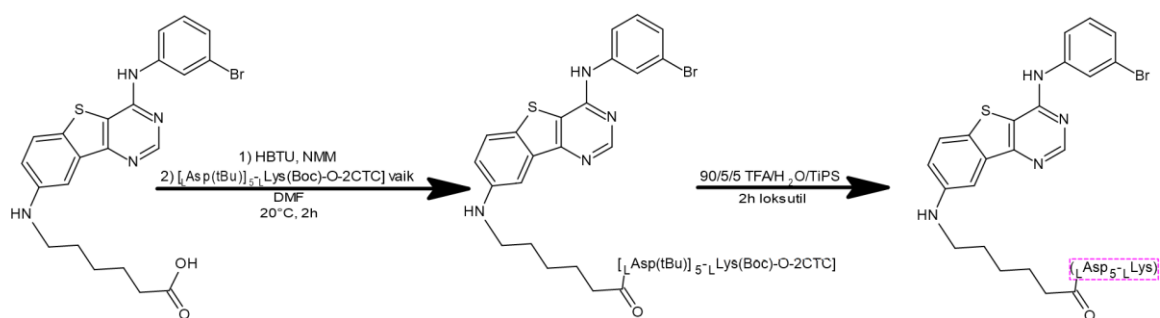


Joonis 13 aine 7 sünteesiskeem

Produkt lahustati metanoolis ja kokku lisati 300 µl 5 M NaOH vesilahust ning 500 µl destilleeritud vett. Reaktsiooni kestvus oli 3 h ning seda monitooriti TLC abil (Lisa 12).

Metanool ja osa vett eemaldati vaakumi all, lisati 4 ml vett ning kolvi sisu viidi esimesse 15 ml tuubi. Kolbi loputati 2 korda 1,5 ml veega. Tuubi tsentrifuugiti 2 min 4000 rpm juures ning vedelik viidi teise tuubi. Esimest tuubi loputati 1,5 ml veega, loksutati korralikult ning tsentrifuugiti 2 korda millega ei õnnestunud suspensiooni lõhkuda. Teise tuubi lisati 2 ml 1 M KHSO₄, loksutati ning tsentrifuugiti 2 korda. Moodustus sade tuubi põhja ning pulbrilaadne hüdfoobne sade vedeliku peale. Vee lisamise, õrna loksutamise ning tsentrifuugimise mitmel kordusel vajus osa pindmisest sademest tuubi põhja, ning autor tähendas tuubi põhjas olevatel kihtidel õrna tooni erinevust. Vedelikupealsest sademest võeti proov analüüsiks, vedelik eemaldati pipetiga ning tuubi jäänud sadet pesti 3 korda destilleeritud veega, igal korral loksudades, tsentrifuugides ning eemaldades vedelik pipetiga. Pärast viimast pesu eemaldati veekiht, tuub asetati -18 °C sügavkülma ning hiljem 24 h lüfisaatorisse. Saadi 15 mg ainet mis vastab saagisele 31%.

3.3.4. Aine 8 süntees (peptiidi kinnitamine)



Joonis 14 aine 8 sünteesiskeem

Kasutati Kaido Viht poolt sünteesitud Fmoc-[L-Asp(tBu)]₅-[L-Lys(Boc)]-O-2CTC vaigule kinnitatud kaitserühmadega peptiidi. Pool olemasolevast kogusest viidi uude süstlasse millele lisati 1 ml DMF ning asetati loksutile. 1 h möödudes lisati 1 ml 20% piperidiini lahust ning loksutati veel 5 minutit. Viidi läbi Fmoc test, mille tulemusel arvutati peptiidi koguseks 11,1 µmol.

Mikrotsentrifuugituubi kaaluti 5,0 mg ainet 7, 6,4 mg HBTU ning lisati 0,5 ml DMF ja 3,7 µl N-metüül-morfoliini (NMM). Segu loksutati, lasti reageerida 2 min ning viidi üle peptiidiga süstlasse. Süstal suleti korgiga ning loksutati 2 h. Reaktsioonisegu pesti 5 korda DMF-ga, millest 3 esimest koguti kokku, 5 korda isopropanooliga ning 5 korda diklorometaaniga.

3.3.5. Peptiidi eemaldamine 2-CTC vaigult

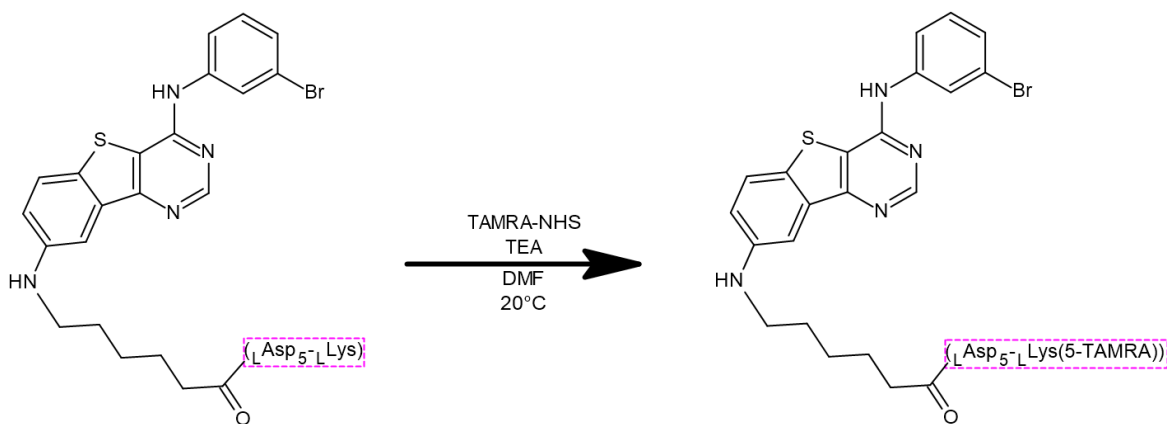
27 mg vaigule (kogu produkt) lisati 300 µl eelnevalt segatud 270 µl TFA, 15 µl H₂O, 15 µl TiPS segu ning loksutati 2 h. Reaktsioonisegu vedelik ja vaigu pesemiseks kasutatud 2 korda 0,5 ml ning 1 kord 1 ml MeOH lisati 10 ml ümarkolbi. Lahustid eemaldati rotoaatoraurustil, lisati 1 ml etanooli ning korrati lahusti eemaldamist.

Produkt puhastati HPLC abil, koguti 3 fraktsiooni ($m/z(M+H^+) = 1190, 1204, 1218$) ning arvutati nende kontsentratsioonid Lambert-Beer'i seadusega. Saadud ained jagati 100 ja 50 nmol portsudeks (Tabel 4).

Tabel 4 aine 8 puhastamisel kogutud fraktsioonid

Aine	Molaarmass (g/mol)	Portsu suurus (nmol)	Kogus (tk)
8a	1189	100	5
8b	1203	100	4
8c	1217	50	4

3.3.6. Aine 9 süntees (5-TAMRA kinnitamine)



Joonis 15 aine 9 sünteesiskeem

3 korda 100 nmol TAMRA-NHS portsudele lisati igale 60 µl DMF. Teises anumal lahustati 2,93 µl trietüülamiini (TEA) 100 µl DMF-is. Reagendid lisati peatükis 3.3.5 sünteesitud ainetele vastavalt tabelile (Tabel 5).

Tabel 5 Aine 9 sünteesil lisatud reagentide kogused

Aine	Kogus (nmol)	Lisatud TEA lahus (µl)	Lisatud TAMRA-NHS lahus (µl)
8a	100	40	90
8b	50	30	60
8c	50	30	30

Reaktsioonianumad suleti ning lasti seista 3 h. Seejärel eemaldati lahusti üleöö lüfisaatoris tsentrifuugides. Põhiprodukti (9a) puhastati HPLC meetodil ning koguti fraktsioon 2 massi-laengu suhtega 1602 (Lisa 13, Lisa 14).

4. Mõõtmised

4.1. Ainete 2 ja 4 luminescents-omadused

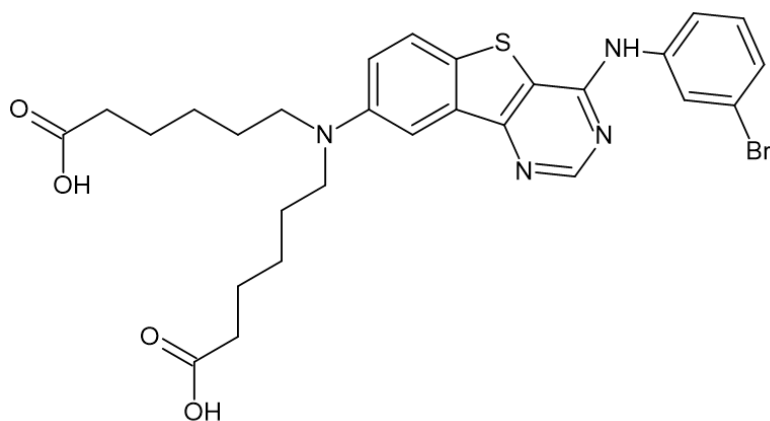
Ergastus- ja emissioonispektrid määrati mikroplaadil PVA maatriksis tehes 5 paralleeli 2,5 nmol ja 3 paralleeli 5 nmol ainega igas süvendis. Kasutati 384 süvendiga mikroplaati (Corning) ja Synergy™ NEO HTS mikroplaadi lugejat (Tabel 2). 5% PVA vesilahus segati uuritava ainega ning kuivatati tõmbekapis üleöö. Kuna PVA aeglustab ligandi liikumist ning vähendab selle hapniku luminescentsi kustutavat toimet, on see hea ja odav alternatiiv FRET uurimiseks ilma kinaasita. Aine 4 spektrid summeeriti, normeeriti ning kombineeriti fosforescentsi spektri. Mõõdeti ka aine 2 emissioonispekter, mille hinnanguline signaal-müra suhe on oodatust väiksem.

Sünteesitud ainega ARC-2303 viidi läbi sidumiskatse, kasutades ensüümi allikaks Darja Lavõgina kasvatatud HeLa rakkude lüsaati (rakuliini allikas: American Type Culture Collection) ning kontrollina konkurentselt seonduvat Gefitinibi. Kasutati 384 süvendiga mikroplaati (Corning), THERMOstar loksutavat inkubaatorit ja PHERAstar mikroplaadi lugejat koos vajalike optiliste moodulitega (Tabel 2). Alustati 30% lüsaadi lahusest, millest tehti kahes paraleelis 8 50% seerialahjendust (A-H) ning lisaks kontroll, kuhu lüsaadi asemel lisati sama ruumala puhvrit. Mõlemas tulbas oli sondi kontsentratsioon 10 nM ja teises tulbas lisaks 10 µM gefitinib. Teise tulba B süvendis tehti sondi pipeteerimisel viga ning see punkt on lüsaadi kontsentratsiooniga võrreldud tulemustest välja jäetud. Pärast sondi ja gefitinibi lisamist ning enne mõõtmist pandi mikroplaat 30 °C juures 150 rpm loksutile inkubeerima.

Mõõdeti fluorestsentsi anisotroopiat ning jäädvustati fosforestsentsi kustumiskõver vahemikus 50-390 μ s, kus ergastusvälgu maksimaalne intensiivsus on normaliseeritud 10000-ks.

4.2. Aine 7 kõrvalprodukti analüüs

Proov lahustati metanoolis ning analüüsiti HPLC/MS meetodil koos diiodrivi detektoriga enne massispektromeetrit. Massispektris kõige tugevama signaaliga komponendi $m/z(M+H^+)$ väärtused 599 ja 601 kattuvad alapeatükis 3.3.3 (alküülimine) topelt-alküülitud ning järgnevas peatükis hüdrolüüsitud produkti molekulaariooniga (Joonis 16). Kaks sarnase intensiivsusega väärtust viitavad Br olemasolule molekulis.



Joonis 16 aine 7 kõrvalprodukti tõenäoline struktuur

4.3. ARC-2302 ja ARC-2303 fosforestsentsispektrid

Spektrid mõõdeti SYNERGYneo mikroplaadilugejaga Corning® 384 süvendiga ümara põhjaga mustal mikroplaadil (Tabel 2). Proovid lahustati vees, segati mikroplaadil 5% PVA lahusega ning jäeti 24 h tõmbekappi kuivama. Mõlema ainega tehti 2 erineva kontsentratsiooniga mõõtmist 5 paraleeliga (kokku 20). ARC-2302 8 ja 2 nmol ning ARC-2303 200 ja 50 pM igas augus. Graafikute koostamiseks kasutati ainult kangemate lahuste mõõtmistulemusi. Signaali integreerimisvahemikuks määrati 100-2000 μ s.

5. Tulemused ja arutelu

5.1. Esimene süntees

Sünteesitud N-{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-4-ül)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen -2-karboksamiid on mõeldud edasise sondide arenduse ja sünteesi algmaterjaliks.

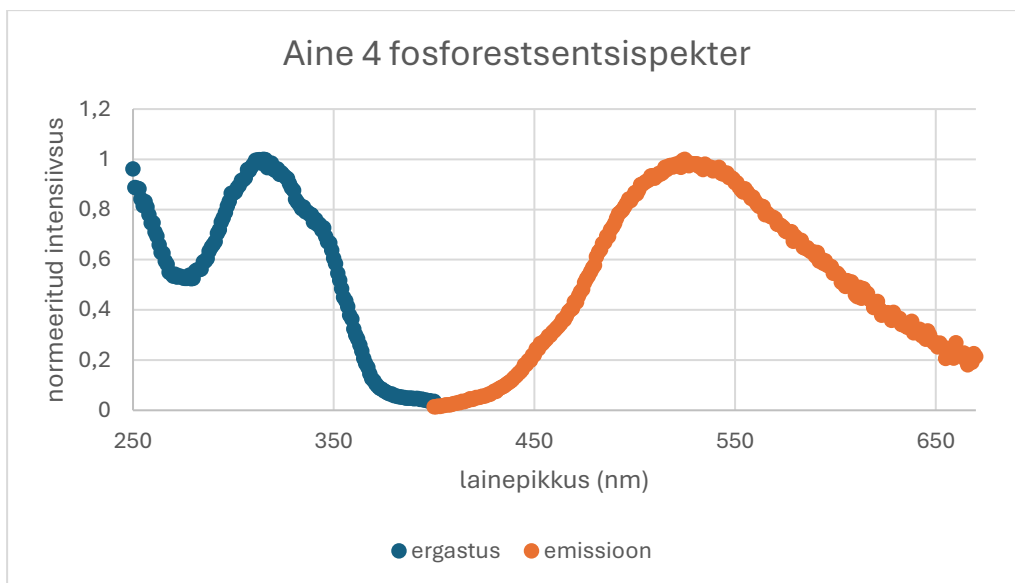
Nitrofenooli redutseerimise (3.2.1) saagis on teoreetilisest väiksem kuna algselt ei kasutatud valgustundliku produkti jaoks punast lampi. Kõige kriitilisem oli kuivatamise etapp sest lahusti kaitses vähesel määral ainet valguse eest. Lisaks saaks saagist parandada SnCl_2 hüdraadi vahetamisel veevaba soola vastu.

Amiidi moodustamisel (3.2.2) kasutati minimaalsest rohkem lahustit, mille eemaldamine osutus hiljem aeganõudvaks. Seda peegeldab ka 102% saagis, mis tuleneb pärast kuivamist alles jäänud DMF-ist ja muudest kõrvalsaadustest.

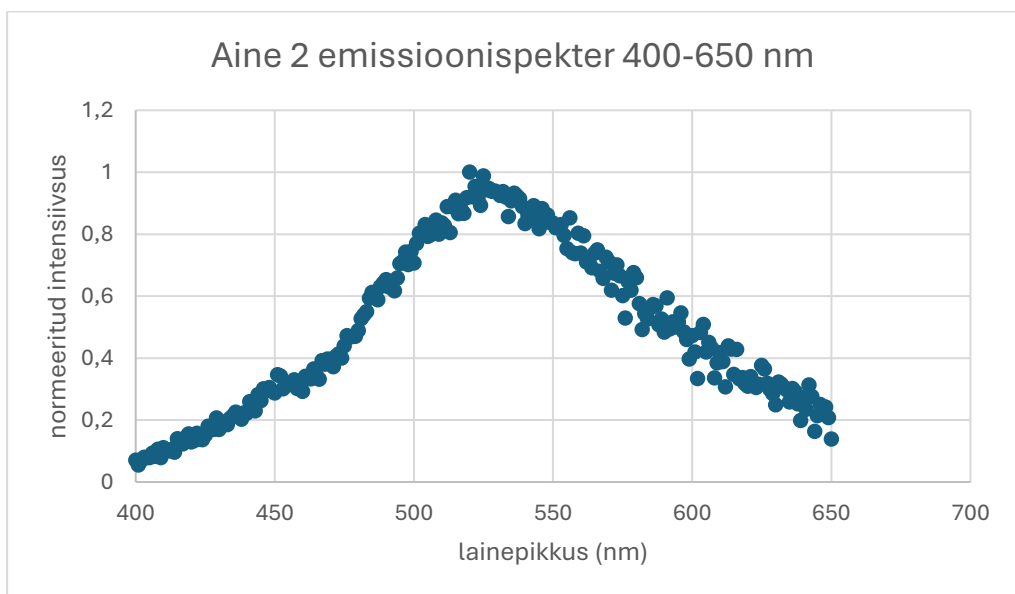
Kolmandas reaktsioonis (eetri moodustamine) (3.2.3) kasutati POCl_3 nii lahusti kui reagentina kokku 6 ml. Suuremas skaalas sünteesiks tuleks leida alternatiivne meetod kuna selle vaakumi all destilleerimine ei mõju pumbale hästi. Lisaks on POCl_3 neutraliseerimine veega eksotermiline ning suure kogusega võib see ohtlikuks muutuda. Produkt moodustas pärast kuivatamist kristallid, mis viitab heale puhtusele. Selles töös ei kasutatud reaktsioonis (3.2.3) sünteesitud ainet kuid tulevikus saab seda kasutada ARC-sondide arenduses.

Neljandas reaktsioonis (3.2.4) kasutati samuti optimaalsest rohkem lahustit aine 2 üle kandmiseks väiksemasse kolbi, mis võis pikendada reaktsiooni aega. Kuna ajaliselt viidi neljas reaktsioon läbi enne kolmandat, kasutati siin Erki Enkvist-i sünteesitud ainele 3 identset algainet. Produktist mõõdetud massispektril on põhiaine signaal $m/z(M+H^+)=518$ olemas (Lisa 15).

Puhastatud ained 2 ja 4 jagati 100 nmol portsudeks ning sildistati vastavalt MV7 ja MV8. Mõõdeti nende fosforesentsi ergastus- ja emissioonispektrid PVA-polümeeris. Aine 2 emissioonispektri (Joonis 18) madala intensiivsuse ja müra tõttu ei mõõdetud selle ergastusspektrit. Aine 4 mõõdetud kombineeriti fosforesentsi spektri (Joonis 17) põhjal on see sobilik ligand TS-FRET EGFR sondide edasiseks arenduseks.



Joonis 17 N-{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2-d]püridimiin-4-üül)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen-2-karboksamiidi kombineeritud ergastus (mõõdetud emissioon 525 nm) ja emissioonispektrid (ergastus 315 nm, viivitus 100 μ s ja integratsiooniaeg 2000 μ s).



Joonis 18 5-kloro-N-(4-hüdroksüfenüül)tiofeen-2-karboksamiidi emissioonispekter (ergastus 320 nm, viivitus 100 μ s ja integratsiooniaeg 2000 μ s).

5.2. Teine süntees

Töö tulemusena valmis linkeriga ühendatud peptiidi DDDDDK (D - L-aspargiinhape, K – L-lüsiin) ja N^4 -(3-bromofenüül)[1]bensotieno[3, 2-*d*]pürimidiini fragmentidest koosnev potentsiaalne bisubstraatne EGFR sond ARC-2302 ning selle 5-TAMRA-ga märgistatud derivaat ARC-2303.

Esimest reaktsiooni (nitrorühma redutseerimine) (3.3.1) alustati varem Ivar Golubenko poolt sünteesitud N -(3-bromofenüül)-8-nitro[1]bensotieno[3,2-*d*]pürimidiin-4-amiin toorproduktist. Kuna seda eelnevalt ei puhastatud, on tegelik saagis mõnevõrra suurem kui arvutatud 34%. Nitrorühma redutseerimine viidi läbi toatemperatuuril ilma inertatmosfäärита parafiinkilega kaetud korgiga kolvis koos magnetpulga ja -segajaga. Redutseerimissegul lasti reageerida 3 päeva, pärast mida kallati see jaotuslehtrisse ning neutraliseeriti 5% NaHCO₃ lahusega koonuskolvis. Viidi läbi ¹H NMR analüüs, mille tulemusel määrati struktuuriga kokku viidud integraalidest pindalade vahekorra ligikaudu 1:3 suhe aine 7- ja 8-amino asendatud isomeeridest (Lisa 16). Need isomeerid olid tekkinud eelmise etapi nitreerimise reaktsioonis. Sünteesi jätkati toorseguga.

Alküülimisel (3.3.2) kasutati 1,3 ekvivalenti metüül 6-bromo-heksanaati, et minimaliseerida topelt-alküülitud produkti teket. Sellele vaatamata moodustus seda üsna palju, mis selgus järgmises etapis. On võimalik, et eelmise etapi saagis on arvutatust väiksem ning kasutati liiga palju metüül-6-bromoheksanaati. TLC eluendis kloroformi ja metanooli vahekorda optimeerides selgus, et väike kogus metanooli on vajalik ning optimaalne eluent on 15:1 kloroform, metanool + 1% DiPEA.

Estri hüdrolyüsi (3.3.3) produkti sadestamisel moodustus üks kiht vee alla ja teine peale. Korduva vee vahetuse, loksutamise ja tsentrifuugimise järel õnnestus osa veepealsest kihist sadestada tuubi põhja, kus autor tähendas õrna tooni erinevust kihtide vahel. Pindmise pulbri massianalüüsil selgus, et tegemist oli enamasti eelmises etapis topelt-alküülitud ning nüüd hüdrolyüsitud kõrvalproduktiga (Joonis 16). Põhiprodukti analüüsiti HPLC-MS meetodil, kus on aine 7 molekulaarioon olemas (Lisa 17).

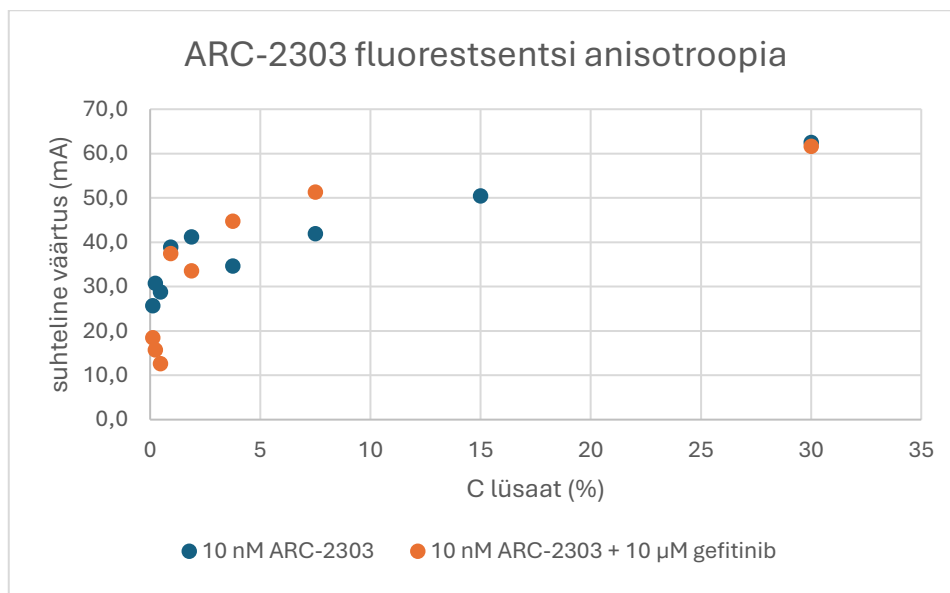
Peptiidi kinnitamiseks (3.3.4) kasutati Kaido Viht poolt 2014. aastal sünteesitud 2-klorotritüül kloriid (2-CTC) vaigule kinnitatud DDDDDK peptiidi, mille hulk määrati maha pestud Fmoc lahuse neelduvusest Lambert-Beer'i seaduse abil kasutades $\epsilon(301\text{nm}) = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Viiendas reaktsioonis (3.3.5) eemaldati peptiidi konjugaat vaigult ning kaitserühmad aspargiinhappe jääkidelt. Kliivimissegu lisamisel värvus vaik punaseks, mis viitab halvale

segamisele või TiPS-i puudumisele segust. Seda märgates lisati TiPS juurde kuid saagis võis selle pärast kannatada. TiPS käitub segus redutseerijana, mis neutraliseerib kaitserühmade eemaldamisel tekkivad reaktiivsed kõrvalsaadused. Produkt puhastati HPLC-MS meetodil ja koguti 3 fraktsiooni massidega 1189, 1203 ja 1217 g/mol (Lisa 18), vastavalt ained 8a, 8b ja 8c. 8b ja 8c massid on aimest 8a 14 ja 28 võrra suuremad, mis võib tuleneda ekstra CH₂ rühmadest. Üks võimalik variant suuremate masside päritolust on alküülimisel (3.3.2) kasutatud metüül 6-bromo-heksanaadi ebapuhtus. Seda saaks kinnitada reagenti NMR analüüsiga kuid selles töös seda ei jõutud teha. Aine 8a lisati andmebaasi ARC-2302 nimega.

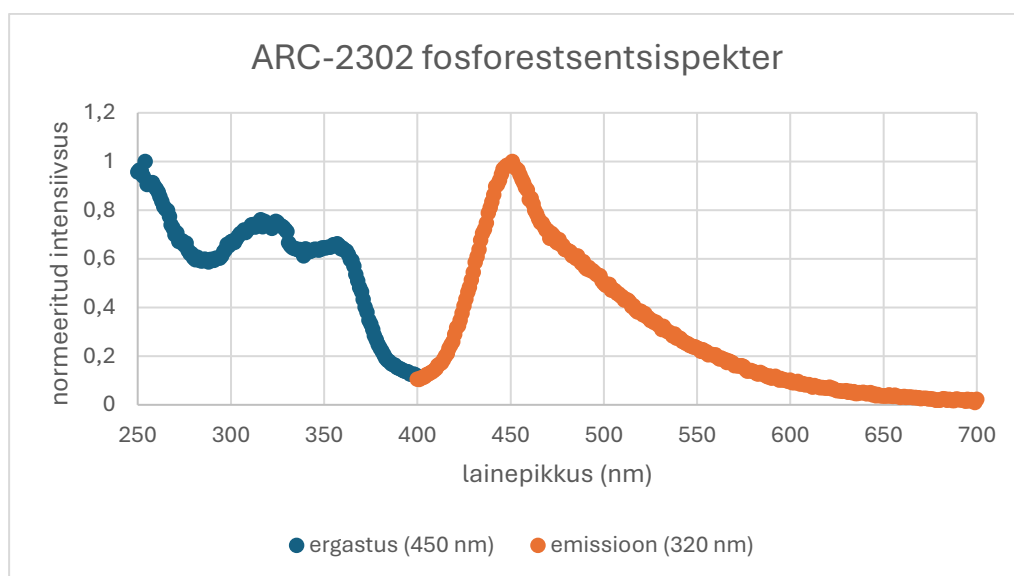
Kuuendas reaktsioonis (3.3.6) kinnitati eelmises etapis eraldatud kolmele ainele 5-TAMRA märgis. Kõik reaktsioonid andsid oodatud massidega produktid 9a (Lisa 13), 9b (Lisa 19), 9c (Lisa 20). HPLC-PDA-MS analüüsiga määrati 9a reaktsioonisegu komponentide massid, fraktsioon 2 (13.16 min) eraldati (Lisa 13) ning kanti andmebaasi ARC-2303 nimega. Ainete 9b ja 9c struktuure ei kinnitatud kuid need hoiti alles.

Ainega 9a viidi läbi sidumiskatse HeLa rakulüsaadiga, kus mõõdeti fluorestsentsi anisotroopiat ja monitooriti aeglahutusega luminesentsi (intensiivsus, eluiga). Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmine näitab sarnaseid tulemusi sõltumatult väljatõrjujaks kasutatud gefitinibi juuresolust, mis viitab kas sondi halvale sidumisele või madalale ensüümi kontsentratsioonile lüsaadis (Joonis 19).

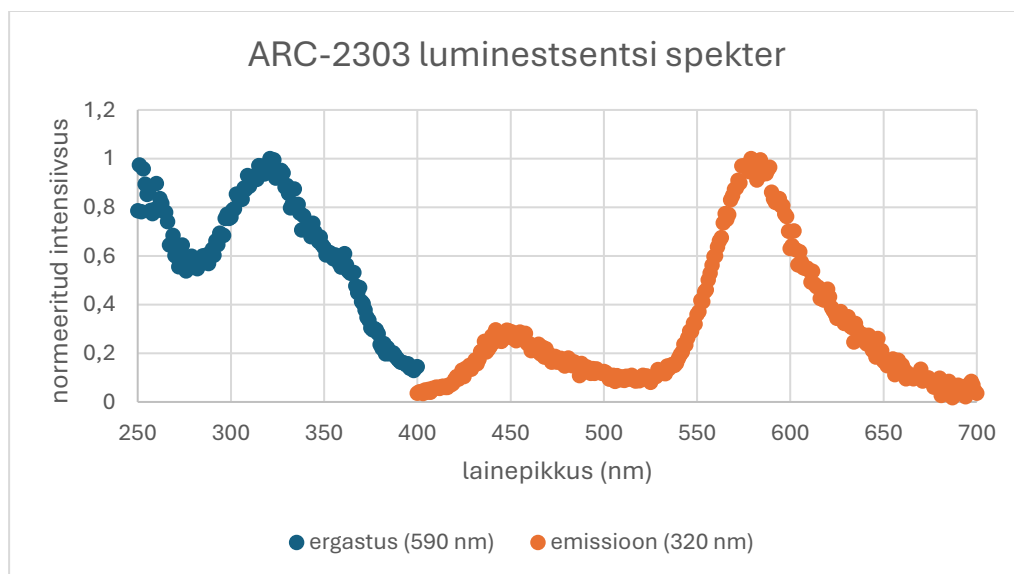


Joonis 19 aine 9a (ARC-2303) fluorestsentsi anisotroopia (ergastus 540-20 nm emissioon 590-20/590-20 nm) HeLa lüsaadi lahjendusseeria

ARC-2303 aeglahutusega luminestsentsispektril PVA-s (Joonis 21) on lisaks 5-TAMRA emissioonijoonele 590 nm juures, mis näitab FRET-i toimumist, aga näha on ka doonori signaal 450 nm juures, mis sama lainepikkusega signaal nagu ARC-2302 fosforestsentsispektril (Joonis 20), mille küljes pole 5-TAMRA luminestsentsmärgist ehk FRET aktseptorit. Doonori signaali olemasolu viitab, et TS-FRET efektiivsus ei ole väga kõrge. Selle põhjuseks võib olla oodatust väiksema lainepikkusega doonori emissioonijoonel maksimum 450 nm, mis ei sobi hästi 5-TAMRA neelduvusmaksimumiga 540 nm.



Joonis 20 aine 8a (ARC-2302) kombineeritud ergastus (mõõdetud emissioon 450 nm) ja emissiooni (ergastus 320 nm) spektrid PVA maatriksis (8 nM 100-2000 μ s)



Joonis 21 aine 9a (ARC-2303) kombineeritud ergastus (mõõdetud emissioon 590 nm) ja emissiooni (ergastus 320 nm) spektrid PVA maatriksis (200 pM 100-2000 μ s)

ARC-2303 seondumiskatse lüsaadiga (Joonis 19) tulemused on ebaselged, kuna rekombinantse ensüümiga katsete jaoks polnud aega. Ergastus- ja emissioonispektrite mõõtmisel PVA-s selgus, et sünteesitud FRET-doonori emissioonimaksimum on oodatust lühema lainepikkusega ning ei sobi hästi lisatud 5-TAMRA märgisega. Seda oleks saanud ennetada viies, läbi sama mõõtmise enne peptiidi kinnitamist ja märgise lisamist. Kuna ARC-2302-1 puudub 5-TAMRA fragment, siis on võimalik tulevikus proovida märgiseid, mille neeldumismaksimum on lühematel lainepikkustel. (Pilt 1)



Pilt 1 ARC-2302 (üleval) ja ARC-2303 (all) PVA maatriksis UV lambi all

6. Kokkuvõte

Epidermaalse kasvufaktori retseptor osaleb naharakkude elutsüklis tähtsates funktsioonides nagu metabolismi ja autofaagia reguleerimises. Selle liigaktiivstust ja mutatsioone on seostatud paljude kartsinoomide ehk epiteelkoe vähkkasvajate arenguga, mis teeb sellest mõnede kasutusel olevate vähiravimite sihtmärgi. Ühe ravimi kasutamine võib viia ravile resistentsete mutatsioonide tekkeni ning sellepärast on vajalik pidevalt arendada uusi ravimeid, mis on mutantide vastu efektiivsed.

EGFR-i sihtmärgina kasutatavatest ravimitest on selles töös asjakohased türosiini kinaasi inhibiitorid (TKI). Sonde saab kasutada uute ravimite seonduvuse hindamiseks ja ensüümi kontsentratsiooni määramiseks lüsaadis.

Töö eesmärk oli sünteesida [1]bensotieno[3,2-d]pürimidiin-4-amiin fragmenti sisaldavaid potentsiaalselt luminesceerivaid EGFR ligande ning uurida nende fotoomadusi, mis sai täidetud.

Töö tulemusel sünteesiti 2 bensotieno[3,2-d]pürimidiin fragmenti sisaldavat ainet, millest esimene on väike molekul (süntees 4 etappi) ja teine keskmise suurusega peptiidkonjugaat (süntees 6 etappi). Esimene sünteesitud aine omas fosforesentsi ning seda saab kasutada algmaterjalina tulevikus läbiviidavates katsetes ja bisubstraatsete kinaasi sondide arendamisel.

N-{4-[(8-bromo[1]bensotieno[3,2-*d*]püridimiin-4-üül)oksü]fenüül}-5-klorotiofeen-2-karboksamiidi süntees koosnes neljast etapist. Selle fosforesentsi ergastus ja emissioonimaksimumideks PVA-s mõõdeti 315 ja 525 nm.

ARC-2302 ning selle 5-TAMRA-ga märgistatud derivaadi ARC-2303 sünteesid koosnesid vastavalt viiest ja kuuest etapist. Nende luminescentsomaduste mõõtmistulemuste alusel saab järeldada, et ARC-2303 ergastamisel toimub FRET, aga 5-TAMRA pole optimaalne aktseptor kuna selle neeldumismaksimum (510 nm) on doonori emissioonimaksimumist (450 nm) suurema lainepikkusega.

7. Kasutatud kirjandus

- Braslavsky, S. E. (2007). Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 79(3), 293–465. <https://doi.org/10.1351/pac200779030293>
- Enkvist, E., Vaasa, A., Kasari, M., Kriisa, M., Ivan, T., Ligi, K., Raidaru, G., & Uri, A. (2011). Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chemical Biology*, 6(10), 1052–1062. <https://doi.org/10.1021/cb200120v>
- Hirata, S. (2017). Recent Advances in Materials with Room-Temperature Phosphorescence: Photophysics for Triplet Exciton Stabilization. *Advanced Optical Materials*, 5(17), 1700116. <https://doi.org/10.1002/adom.201700116>
- Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T., & Kuriyan, J. (2015). A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 739–764. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034402>
- Kuijt, J., Ariese, F., Brinkman, U. A. Th., & Gooijer, C. (2003). Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 488(2), 135–171. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00675-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00675-5)
- Manoharan, G. B., Enkvist, E., Kasari, M., Viht, K., Zenn, M., Prinz, A., Filhol, O., Herberg, F. W., & Uri, A. (2015). FRET-based screening assay using small-molecule photoluminescent probes in lysate of cells overexpressing RFP-fused protein kinases. *Analytical Biochemistry*, 481, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.04.009>
- Şandor, A., Ionuţ, I., Marc, G., Oniga, I., Eniu, D., & Oniga, O. (2023). Structure–Activity Relationship Studies Based on Quinazoline Derivatives as EGFR Kinase Inhibitors (2017–Present). *Pharmaceuticals*, 16(4), 534. <https://doi.org/10.3390/ph16040534>
- Shaban, N., Kamashev, D., Emelianova, A., & Buzdin, A. (2023). Targeted Inhibitors of EGFR: Structure, Biology, Biomarkers, and Clinical Applications. *Cells*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.3390/cells13010047>
- Shin, D.-Y., Na, I. I., Kim, C. H., Park, S., Baek, H., & Yang, S. H. (2014). EGFR Mutation and Brain Metastasis in Pulmonary Adenocarcinomas. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(2), 195–199. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000069>
- Showalter, H. D. H., Bridges, A. J., Zhou, H., Sercel, A. D., McMichael, A., & Fry, D. W. (1999). Tyrosine Kinase Inhibitors. 16. 6,5,6-Tricyclic Benzothieno[3,2-d]pyrimidines and Pyrimido[5,4-b]- and -[4,5-b]indoles as Potent Inhibitors of the Epidermal Growth Factor

Receptor Tyrosine Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(26), 5464–5474. <https://doi.org/10.1021/jm9903949>

Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12(1), 3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>

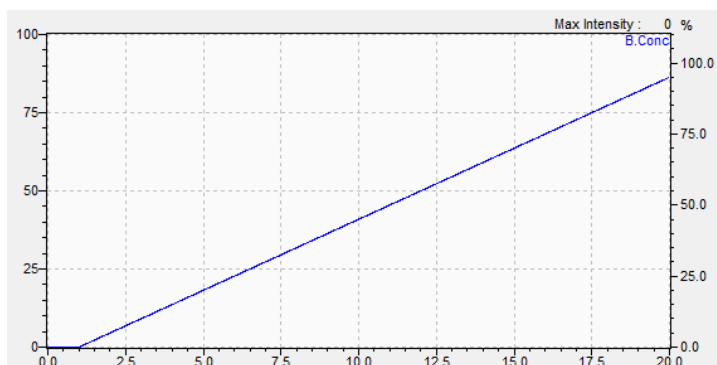
Sugiyama, N., Imamura, H., & Ishihama, Y. (2019). Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Scientific Reports*, 9(1), 10503. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46385-4>

Tan, X., Le, M., Wang, H., Huo, B., Yu, T., Huang, P., Luan, T., & Wen, S. (2023). Design and synthesis of peptide-drug conjugates to double target EGFR. *Phytochemistry Letters*, 56, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.06.003>

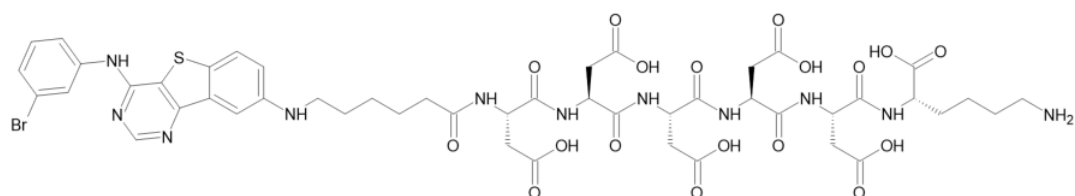
Todsaporn, D., Mahalapbutr, P., Poo-arporn, R. P., Choowongkamon, K., & Rungrotmongkol, T. (2022). Structural dynamics and kinase inhibitory activity of three generations of tyrosine kinase inhibitors against wild-type, L858R/T790M, and L858R/T790M/C797S forms of EGFR. *Computers in Biology and Medicine*, 147, 105787. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.105787>

Vahter, J., Viht, K., Uri, A., Manoharan, G. B., & Enkvist, E. (2018). Thiazole- and selenazole-comprising high-affinity inhibitors possess bright microsecond-scale photoluminescence in complex with protein kinase CK2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(18), 5062–5068. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.003>

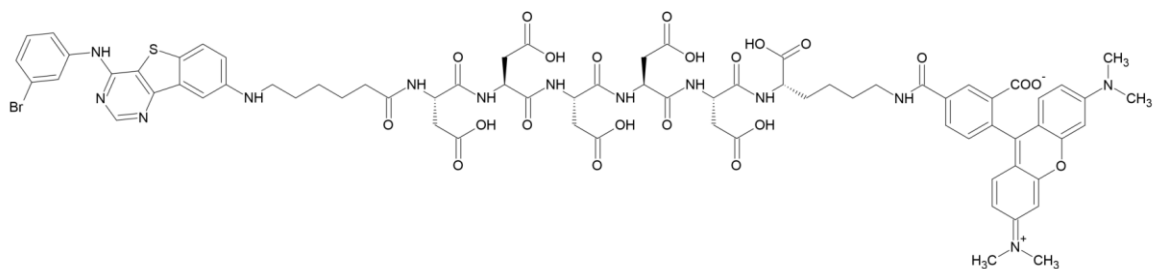
8. Lisad



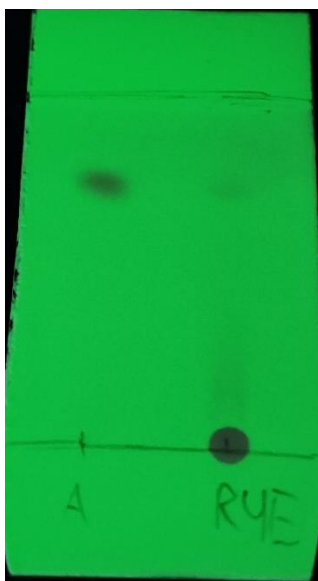
Lisa 1 HPLC eluendi gradient (A - H₂O, B - MeCN, mõlemal lisaks 0,1% TFA)



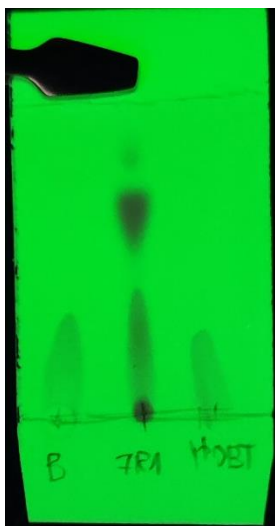
Lisa 2 ARC-2302 struktuur



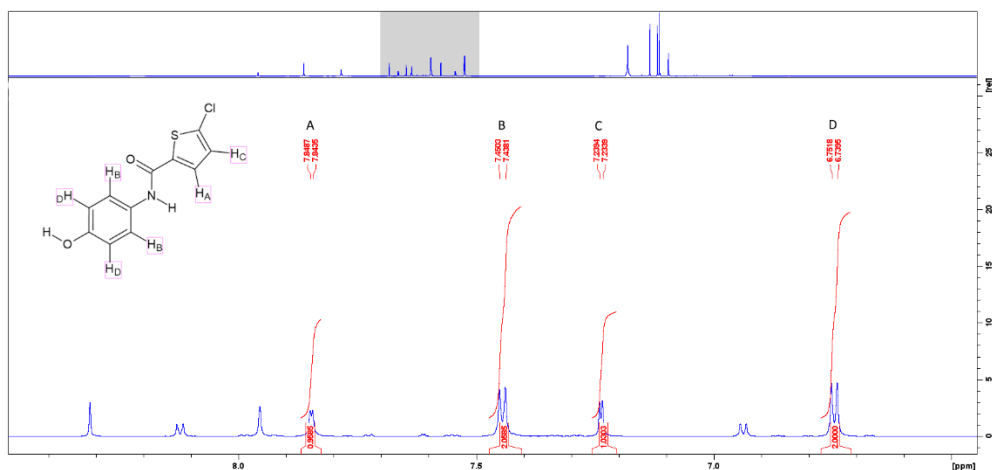
Lisa 3 ARC-2303 struktuur



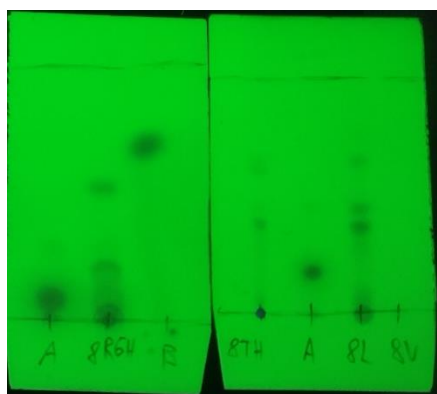
Lisa 4 aine 1 TLC algaine A (p-nitrofenool, $R_f=0,77$) ja 5% NaHCO_3 -ga leelistatud etüülatsetaadiga ekstraheeritud reaktsioonisegu R4E (p-aminofenool, $R_f=0$) (eluent: 1:3 heksaan, etüülatsetaat)



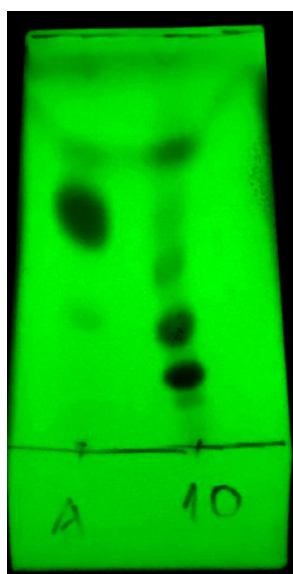
Lisa 5 aine 2 TLC algaine ja reaktsioonisegu proovidega (eluent: 1:3 heksaan, etüülatsetaat)



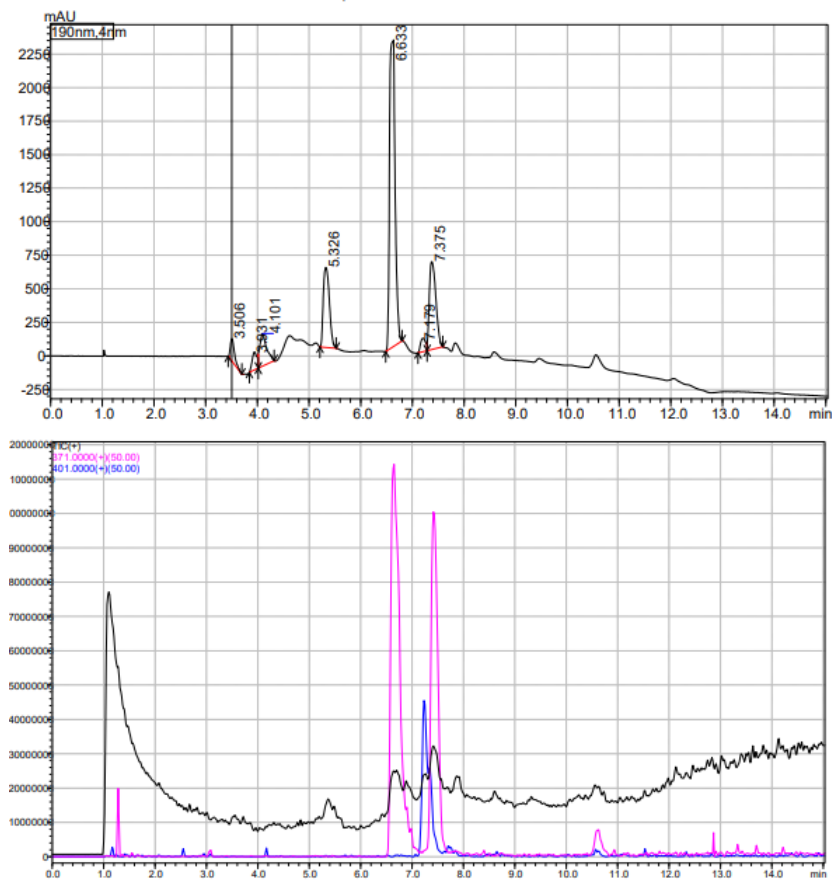
Lisa 6 aine 2 ^1H NMR DMSO- d_6 700MHz spekter (H_A 7,85 ppm; H_B 7,44 ppm; H_C 7,23 ppm; H_D 6,74 ppm) (kasutati Bruker III HD 700 MHz tuumamagnetresonants spektromeetrit ning lahustina deutereeritud dimetüülsulfoksiidi (DMSO- d_6))



Lisa 7 aine 4 TLC algainete (A ja B), hapestatud reaktsioonisegu (8R6H), hapestatud toorprodukti ning ekstraheeritud orgaanilise (8L) ja vesifaasi (8V) proovidega (eluent vasakul 3:1 ja paremal 2:1 heksaan, etüülatsetaat)



Lisa 8 aine 5 TLC algaine A ja reaktsioonisegu (10) proovidega (eluent 20:1 kloroform, metanool)



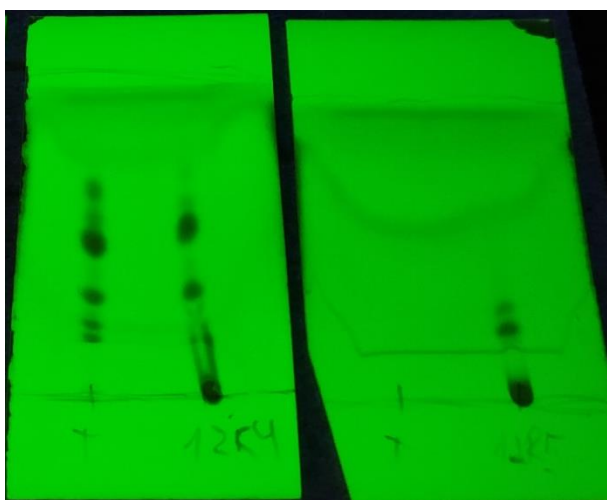
Lisa 9 aine 5 HPLC-PDA-MS massikromatogramm ja neelduvusgraafik 190 nm . Produkti 7- ja 8-amino isomeerid $m/z(M+H^+)=371$ $R_{t1}=6,63$ min $R_{t2}=7,37$ min (üleval: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 190 nm; all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



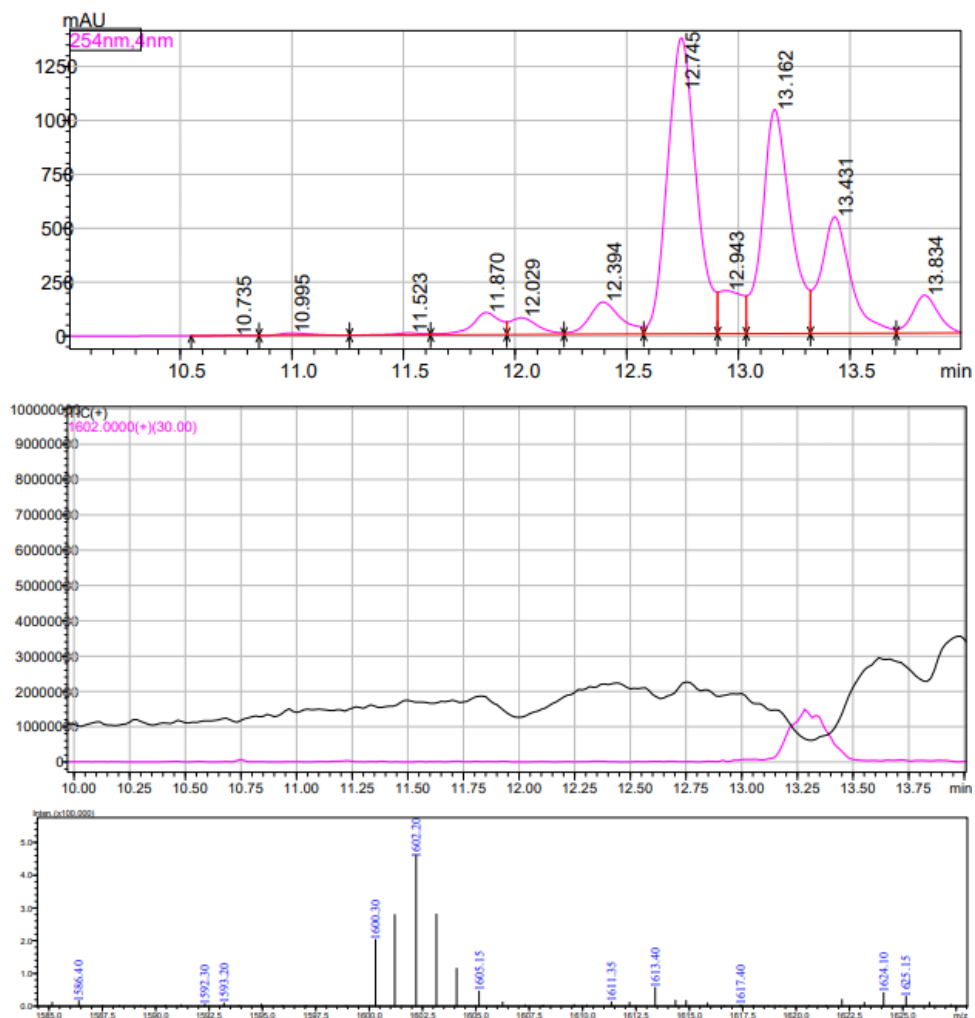
Lisa 10 aine 6 TLC algaine (aine 5) ja reaktsioonisegu 2 prooviga (R2 ja R3) (eluent 15:1 kloroform, metanool + 1% DiPEA)



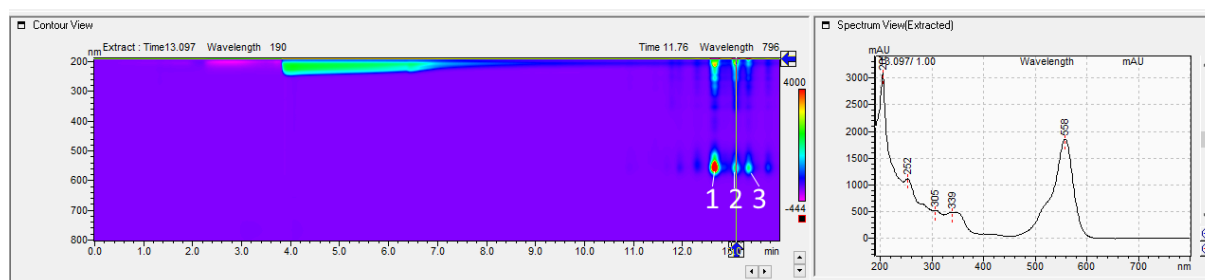
Lisa 11 aine 6 produktiga fraktsioonid 7-9



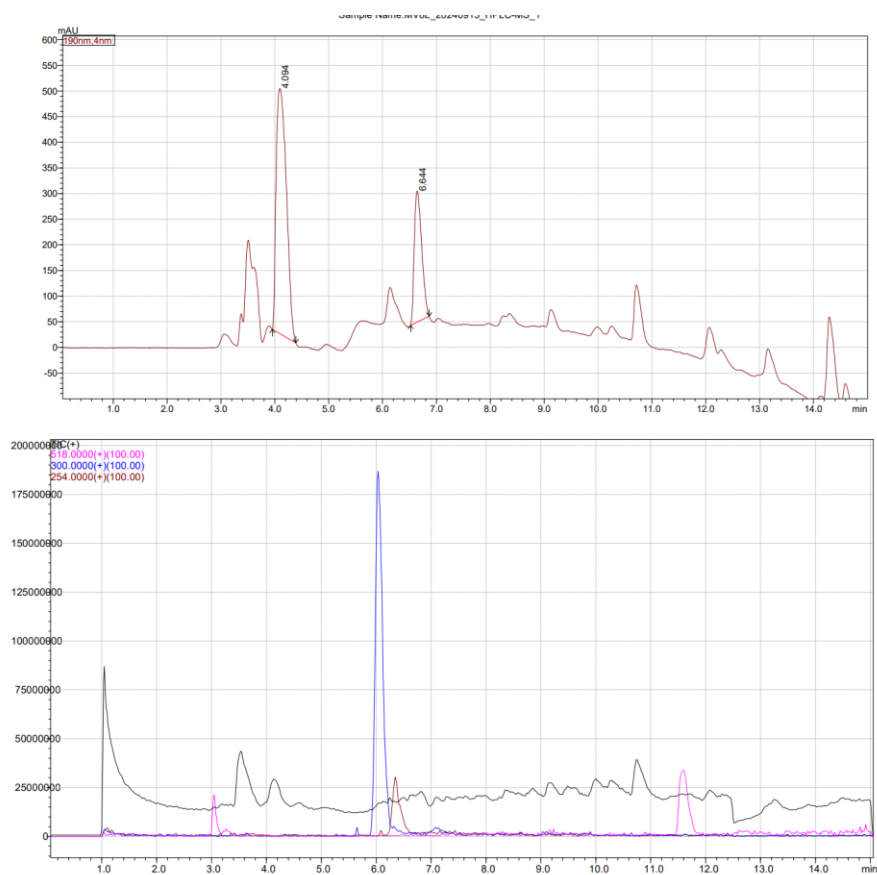
Lisa 12 aine 7 TLC koos algaine toorprodukti (aine 6) (T) ja aine 7 reaktsioonisegu proovidega (eluent 10:1 kloroform, metanool + 1% DiPEA)



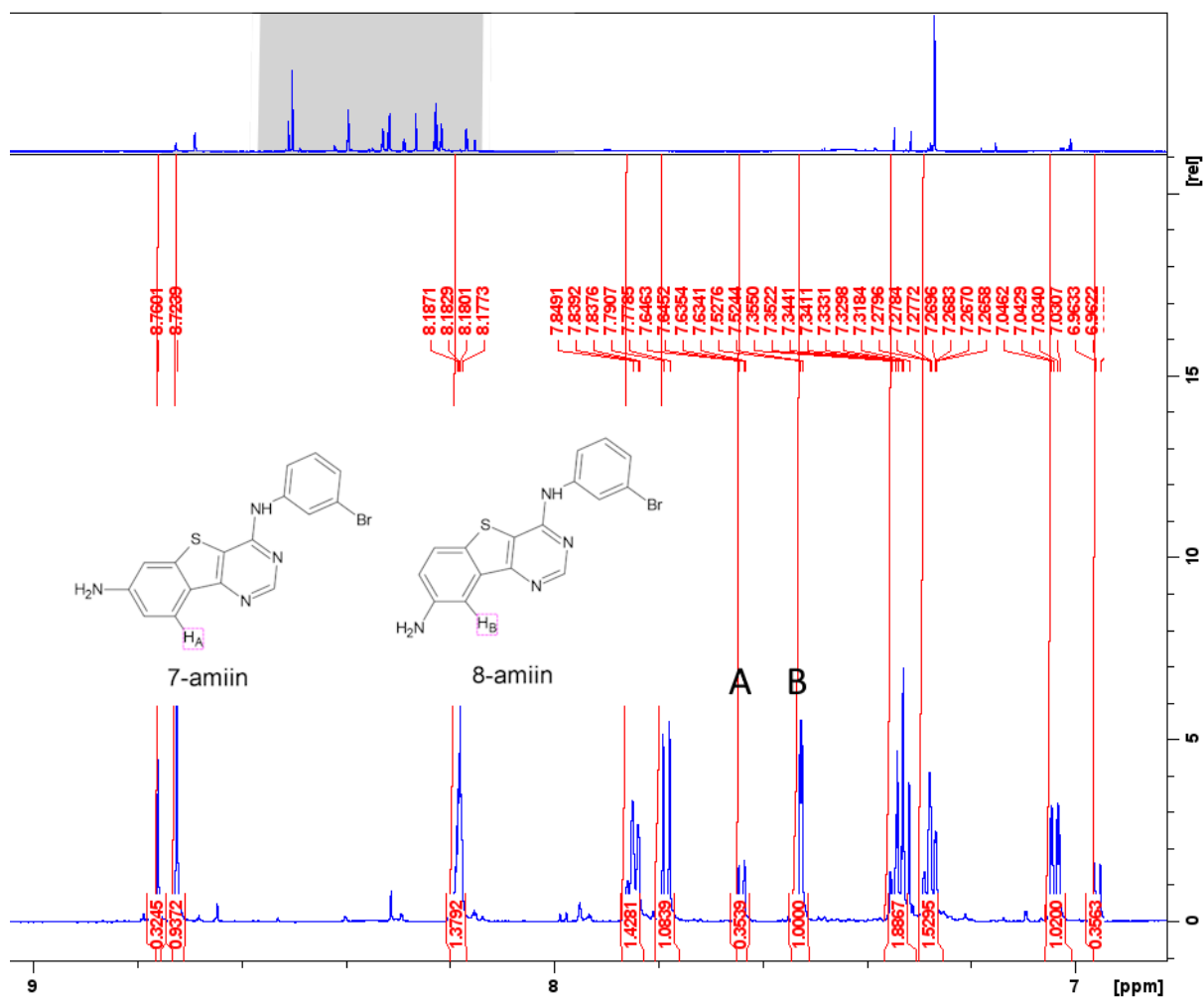
Lisa 13 aine 9a HPLC-MS $m/z(M+H^+)=1602$, $R_t=13.162$ min (üleval: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 254 nm; keskel, all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



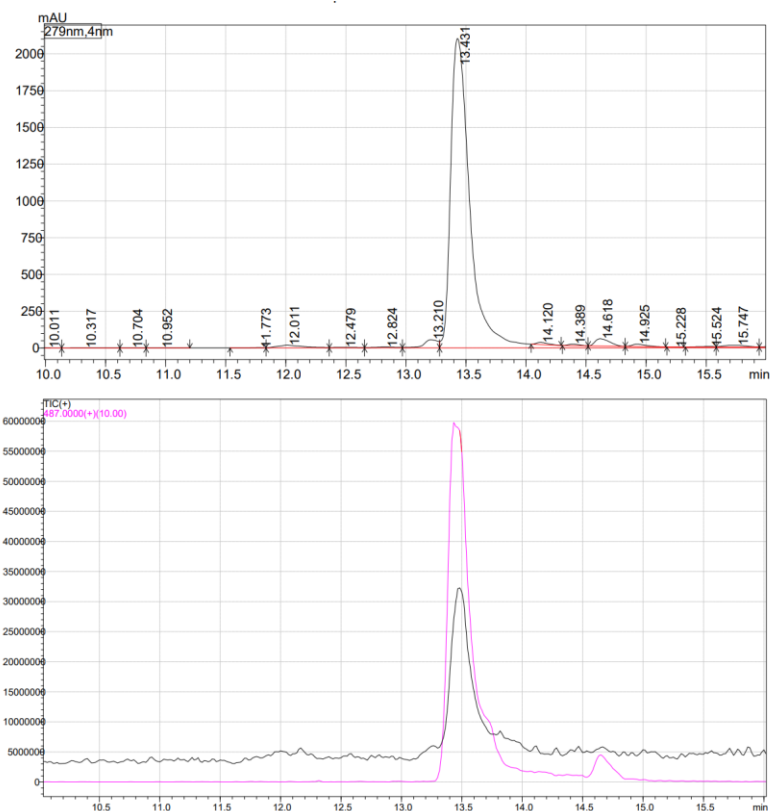
Lisa 14 aine 9a HPLC-PDA puhastamisel kogutud fraktsioonide neeldumisspekter, produkt on nr 2 $R_t=13,1$ min (kasutati UV-Vis detektorit SPD-M20A)



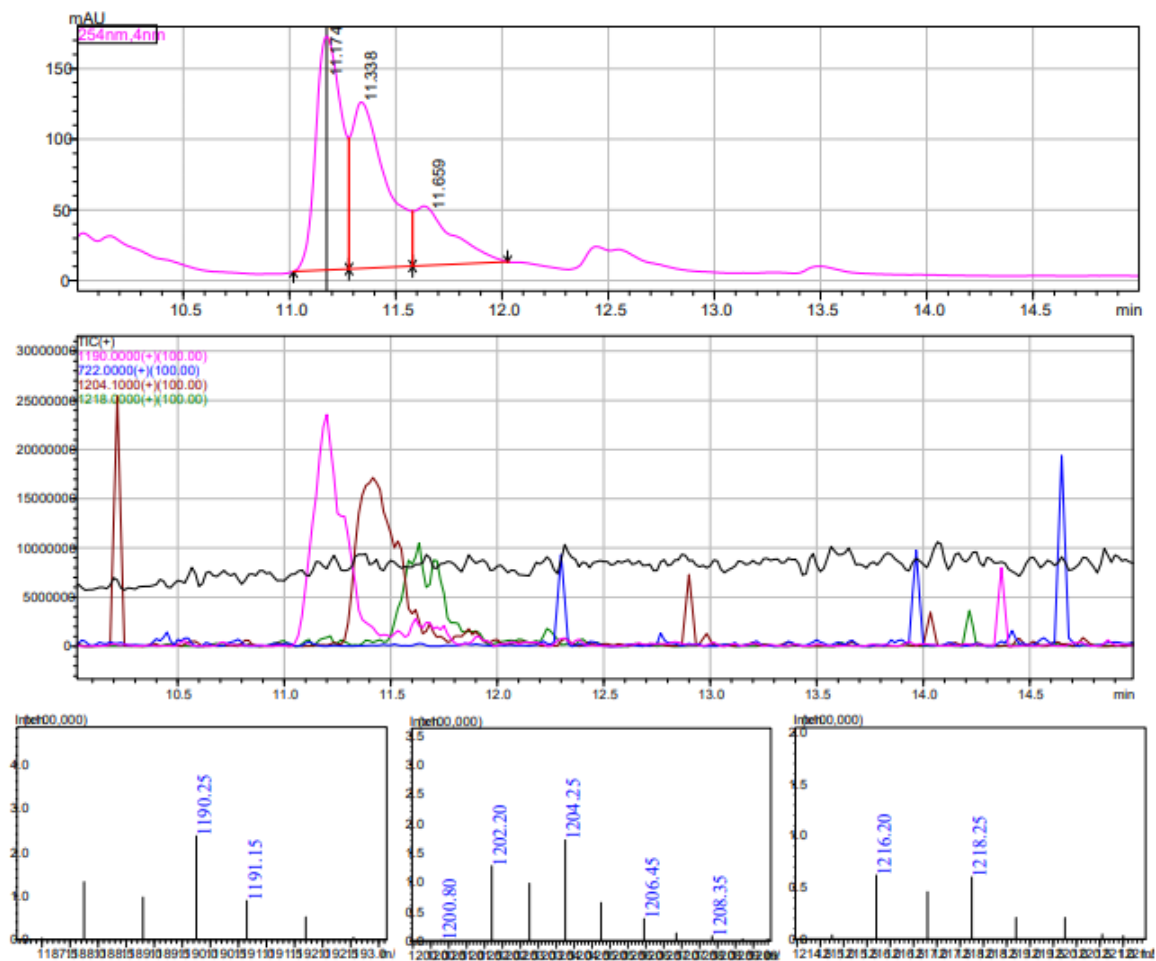
Lisa 15 aine 4 ($M+H^+=518$) koos algaine 3 ($M+H^+=300$) pöördfaas HPLC-MS kromatogramm (üleväl: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 190 nm; all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



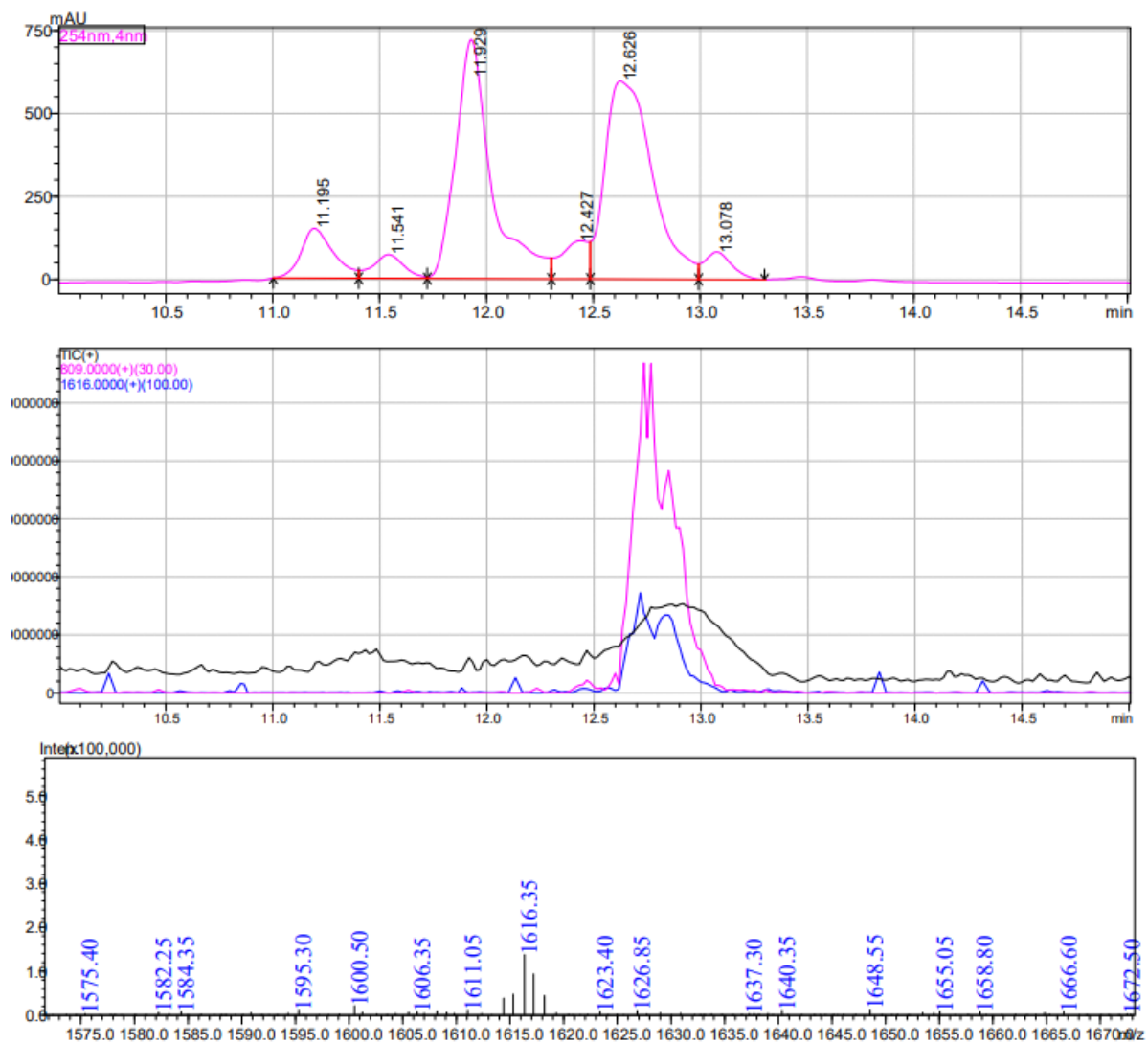
Lisa 16 aine 5 7- ja 8-amiin isomeeride suhe ~1:3. ¹H NMR (kasutati Bruker III HD 700 MHz tuumamagnetresonants spektromeetrit ning lahustina deutereeritud dimetüülsulfoksiidi (DMSO-d₆))



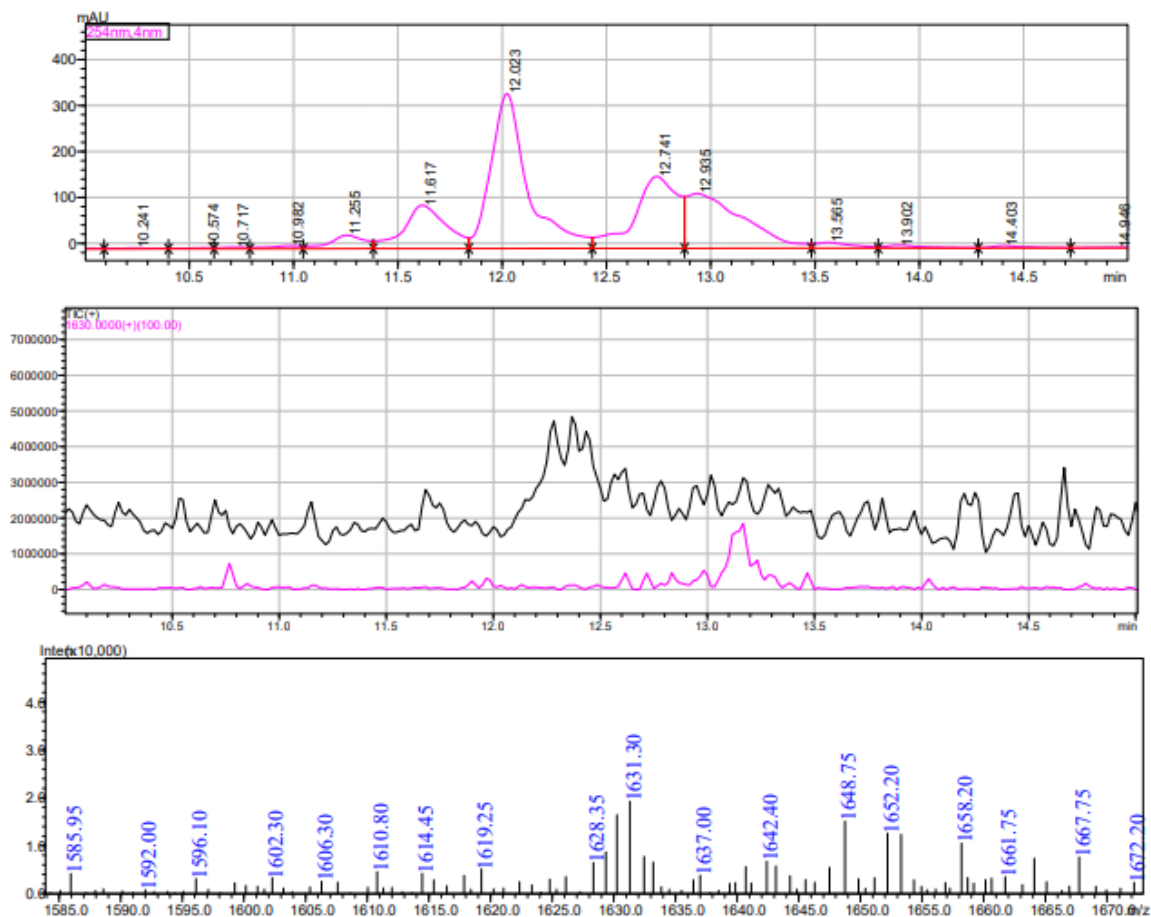
Lisa 17 aine 7 HPLC-DAD-MS $m/z/(M+H^+)=487$ $R_t=13,43$ min (üleväl: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 279 nm; all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



Lisa 18 aine 8 HPLC-PDA-MS $m/z(8a+H^+)=1190$ $R_t=11,17$ min; $m/z(8b+H^+)=1204$ $R_t=11,34$ min; $m/z(8c+H^+)=1218$ $R_t=11,66$ min (üleväl: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 254 nm; keskel, all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



Lisa 19 aine 9b HPLC-MS $m/z(M+H^+)=1616$, $R_t = 12.626$ min (üleväl: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 190 nm; keskel, all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)



Lisa 20 aine 9c HPLC-MS $m/z(M+H^+)=1630$, $R_t = 12.935$ min (üleväl: kasutati UV-Vis detektorit, lainepikkus: 190 nm; keskel, all: kasutati positiivse ionisatsiooni režiimi ning Phenomenex 00G-4633-E0 ja 00G-4435-E0 C18 pöörfaas kolonne temperatuuril 40 °C LCMS-2020 detektoriga)

9. Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Vaher,

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

„Epidermaalse kasvufaktori retseptori (EGFR) bisubstraatsete sondide arendus“

Mille juhendaja on Erki Enkvist

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

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

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mihkel Vaher

27.05.2025