

(Klikkemi)²

– fremstilling af ikke-naturlige oligosaccharider

Klikkemi er skræddersyet til at fusionere modulære molekyl-fragmenter. Normalt anvendes én bestemt klikreaktion, men kombineres i stedet to forskellige klikreaktioner bliver det muligt at reagere videre uden mellem-liggende oprensning og derved tilgå et større rum af molekyler.

Af Henrik Helligsø Jensen, Institut for Kemi, Aarhus Universitet

Det skulle jo ske - og det gjorde det heldigvis også. Morten Meldal fik vel-fortjent Nobelprisen i 2022 på baggrund af opdagelsen af nok en af de mest anvendelige organisk kemiske reaktioner til sammenkobling af to molekylære fragmenter. Stort tillykke til Morten, til Christian for at være med til at opdage reaktionen og til kemifaget i Danmark for den fornemmeste pris.

Den omtalte reaktion finder sted mellem en endestillet alkyne-funktionalitet og en azid-gruppe ved behandling med en kobber(I)-katalysator under dannelse af en såkaldt 1,2,3-triazol (skema 1A) [1-2]. Den refereres ofte til som CuAAC (kobberkatalyseret azid-alkyn cycloaddition). Transformationen fandt hurtigt mange anvendelser og vi har endnu langt fra set alt til anvendelserne af denne kobling. Den er blevet synonym med et koncept introduceret kort forinden af K.B. Sharpless, der kaldte sådanne robuste og effektive reaktioner, som kan foregå under milde betingelser (eksempelvis vand ved stuetemperatur) for klikreaktioner [3].

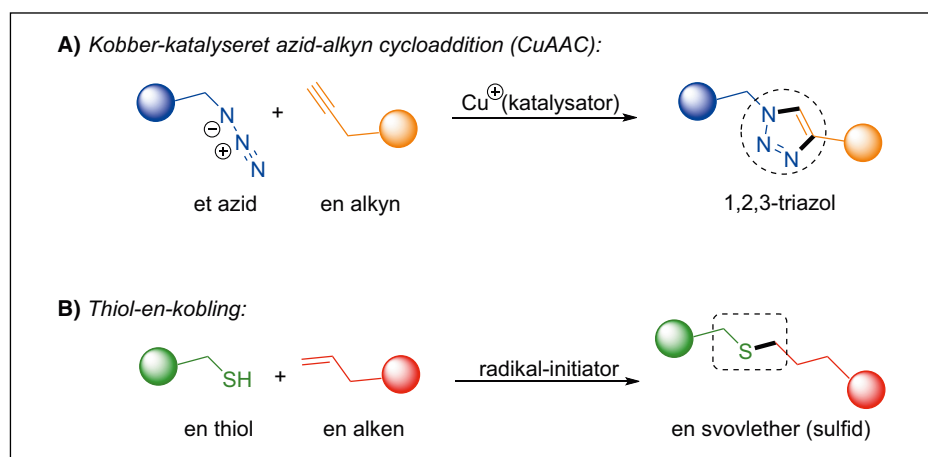
Ifølge den oprindelige definition er Mortens og Christians reaktion vel nok prototypen på en klikreaktion, men der findes andre af slagsen. Et eksempel herpå er thiol-en-reaktionen, der, som navnet antyder, finder sted mellem en svovlbaseret alkohol (en thiol) og en alken (skema 1B) [4]. Denne reaktion foregår gennem en radikalproces, hvor en uparret elektron på svovl-atomet først dannes med en substøkiometrisk mængde af en initiator. Senere reagerer svovl-radikalet med en alken og danner herved et koblet sulfidprodukt.

Det har ikke været kutyme at bruge mere end én klikreaktion til at løse den kemiske udfordring, man har haft, hvilket sætter en begrænsning på, hvor mange

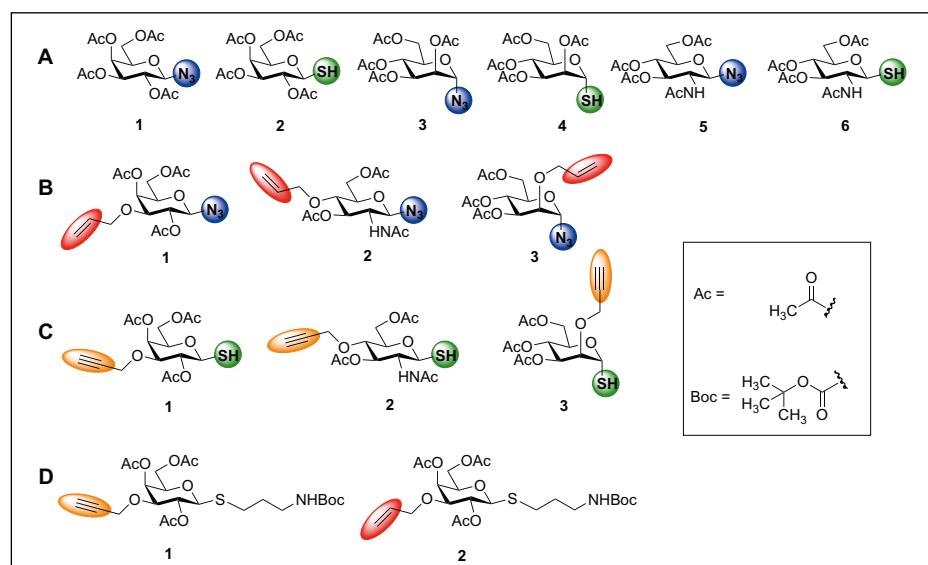
strukturer man kan fremstille. Kombinerer man derimod to klikreaktioner, og antages disse at være orthogonale, og dermed ikke påvirke hinanden, ville man kunne udspænde et todimensionalt rum af mulige produkter frem for det et-dimensionale rum kun én reaktion udspænder.

Klikkemi til fremstilling af ikke-naturlige oligosaccharider

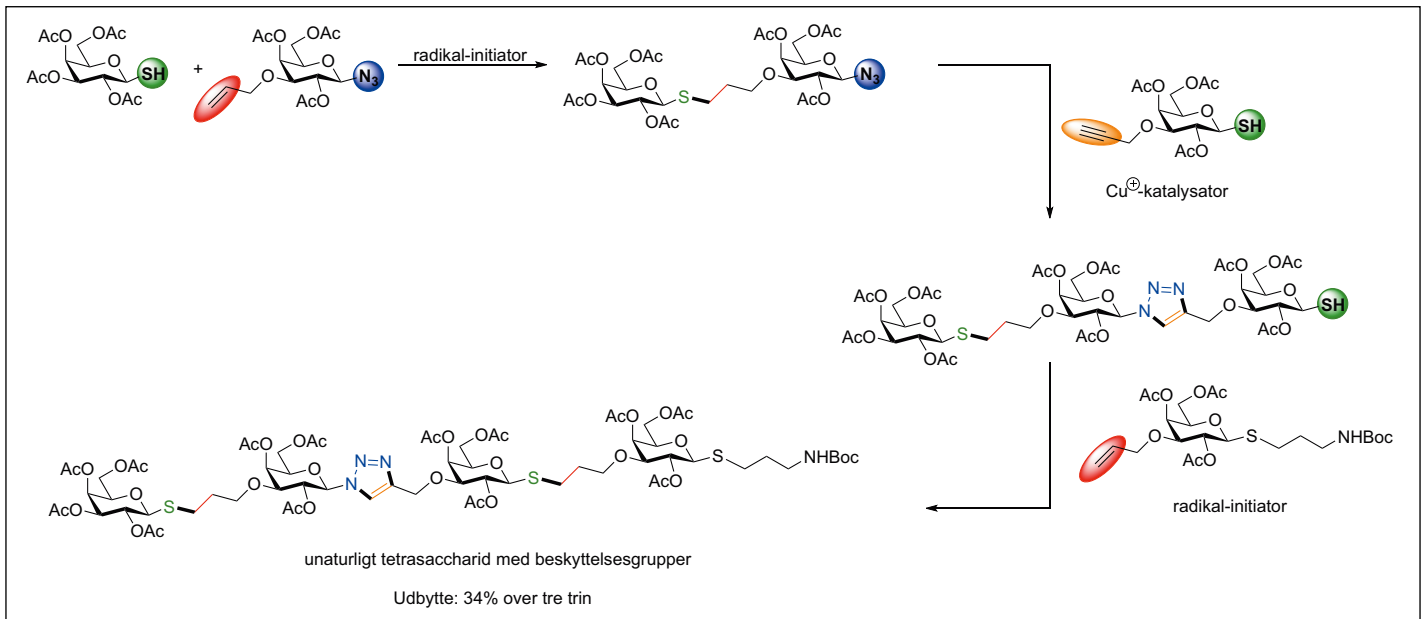
Igennem en årrække har vi været fascinerede af kulhydraters rolle i biologien. Denne eksemplificeres måske bedst ved den genkendelsesproces, der finder sted mellem en ægcelle og en sædcelle, før en befrugtning kan ske. Her skal



Skema 1. Fire funktionelle grupper (azid, alkyne, thiol og alken) og deres klikreaktioner.



Figur 1. Struktur over forskellige monosaccharid-byggesten opdelt i grupper A til D.



Skema 2. Syntese af ikke-naturligt tetrasaccharid.

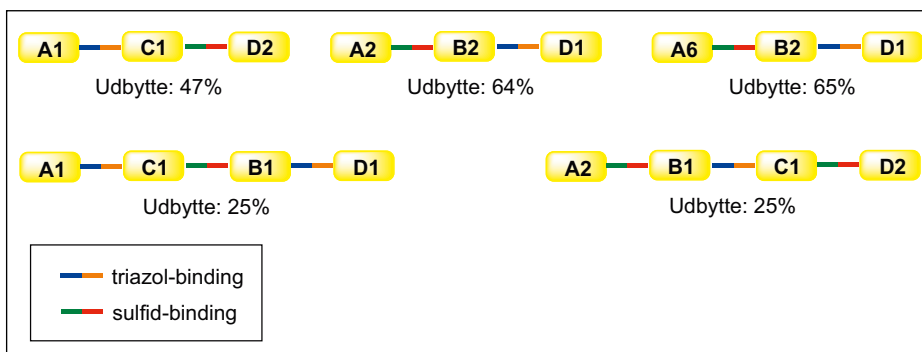
et protein på den ene celle genkende et kulhydrat (et oligosaccharid) på den anden celle [5]. Naturen rummer mange eksempler på lignende genkendelser mellem protein og oligosaccharid og kan således bruges til at påvirke biologiske processer.

Selvom de gængse metoder til fremstilling af de naturlige oligosaccharider ligger vores hjerte nært som specialister, er kemisk syntese af disse ofte meget krævende og måske unødigt komplicerede i forhold til at opnå et biologisk respons. Vi ville undersøge, om der fandtes en lettere vej til protein-genkendelse ved at bygge ikke-naturlige efterligninger af oligosaccharider [6]. Med baggrund i de to klikreaktioner designede vi en række byggesten ud fra naturens mest anvendte monosaccharider, således at disse kunne indgå i en reaktionssekvens, hvor azid reagerer med alkyne og thiol reagerer med alken. Positionen og orienteringen af de reaktive grupper blev valgt til at stemme overens med dem, der anvendes mest ofte i naturen [7].

Byggestenene blev inddelt i fire grup-

per: Elementer fra Gruppe A bruges som den første enhed og bærer kun én reaktiv gruppe (azid eller thiol). Elementer fra Gruppe B og Gruppe C bærer to reaktive grupper. Disse er enten alken/azid-parret eller alkyne/thiol-parret og bruges til forlængelse af kæden. Elementer fra Gruppe D er afsluttende enheder, der ligesom Gruppe A-elementerne kun bærer én reaktiv gruppe (alken eller alkyne) (figur 1, side 13).

Gennem en succesfuld række af eksperimenter lykkedes det at vise: 1) at den sekventielle strategi virkede, og 2) at det var muligt at udføre klikreaktionerne i vilkårlig rækkefølge (skema 2). Her blev forskellige A-elementer reageret i den første reaktion med eksempelvis et B-element i en thiol-en-kobling, hvorefter reaktionssekvensen kunne fortsættes ved et C-element og udføre en CuAAC-kobling og til sidst et D-element og lave den sidste thiol-en-kobling. Resultatet i det nævnte eksempel var et tetrasaccharid, hvor monosaccharid-enhederne var bundet sammen med kemiske bindinger, der ikke findes naturligt i oligosaccharider (figur 2).



Figur 2. Udbytte for syntese af ikke-naturlige tri- og tetrasaccharider med to klikreaktioner.

Binding til protein og biologisk betydning

Reaktionerne blev udført i en blanding af alkohol og vand med 1:1 støkiometri mellem reaktionens koblingspartnere, da de blev vurderet til at være lige dyrebare. De mange alkohol-grupper på monosaccharid-enhederne var esterificerede med estere af eddikesyre for at gøre den endelige kromatografiske oprensning lettere, men det viste sig også muligt at udføre en tilsvarende reaktionssekvens helt uden beskyttelsesgrupper i tilstedeværelse af frie alkoholer.

De estergrupper, der var installeret til at gøre oprensningen af reaktionsproduktet lettere, blev slutteligt fjernet og de frie, ikke-naturlige tri- og tetrasaccharider blev undersøgt for deres evne til at binde til proteiner.

En af de proteiner, der blev undersøgt, var galactin-3. Dette er et humant kulhydratbindende protein og et potentielt terapeutisk mål molekyle, der er impliceret i en lang række af vigtige biologiske processer. Data har vist, at tilstedeværelsen af galactin-3 kan hjælpe til kræftcellers overlevelse, men også at stoffer der binder kraftigt til galactin-3, kan øge virkningen af en kræftbehandling [8].

I studiet fandt vi en nogen grad af binding mellem de fremstillede ikke-naturlige oligosaccharider og galactin-3. Bindingsstyrken steg med øgede antal saccharid-enheder (figur 3).

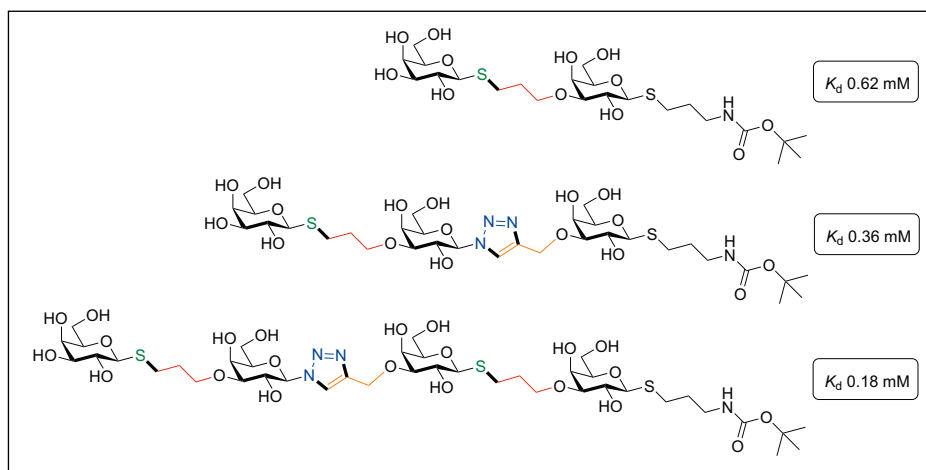
Hurtigt efter Morten og Christians banebrydende opdagelse af den kobberkatalyserede azid-alkyn cycloaddition til dannelse af triazoler blev den anvendt i en række vigtige sammenhænge. Klikreaktionerne og den bio-orthogonale kemi, som er temaet

for Nobelprisen i kemi (2022) (Meldal, Sharpless og Bertozzi) har udgjort grundlaget for utallige videnskabelige opdagelser over de sidste 20 år. Som vist i denne artikel kan reaktionerne bruges til sammenkobling af to små molekyler, men de kan også bruges til at koble små molekyler sammen med store molekyler (eksempelvis proteiner) og sågar til at koble store molekyler sammen med andre store molekyler. Brugen og anvendelserne af klikreaktioner har givetvis endnu ikke kulmineret.

E-mail:
Henrik Helligsø Jensen:
hhj@chem.au.dk

Referencer

1. C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides" *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
2. M. Meldal, C.W. Tornøe, "Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition", *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
3. H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless "Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
4. C.E. Hoyle, C.N. Bowman, "Thiol-Ene Click Chemistry" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573.
5. S. Benoff "Carbohydrates and fertilization: an overview", *Hum. Reprod.* **1997**, *3*, 599-637.
6. A. Brinkø, C. Risinger, A. Lambert, O. Blixt, C. Grandjean, H.H. Jensen "Combining Click Reactions for the One-Pot Synthesis of Modular Biomolecule Mimetics", *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7544-7548.
7. D.B. Werz, R. Ranzinger, S. Herget, A. Adibekian, C.-W. von der Lieth, P.H. Seeberger, "Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis" *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 685-691.
8. N. Martínez-Bosch, A. Rodríguez-Vida, N. Juanpere, J. Lloreta, A. Rovira, J. Albanell, J. Bellmunt, P. Navarro "Galectins in prostate and bladder cancer: tumorigenic roles and clinical opportunities" *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 433-445.



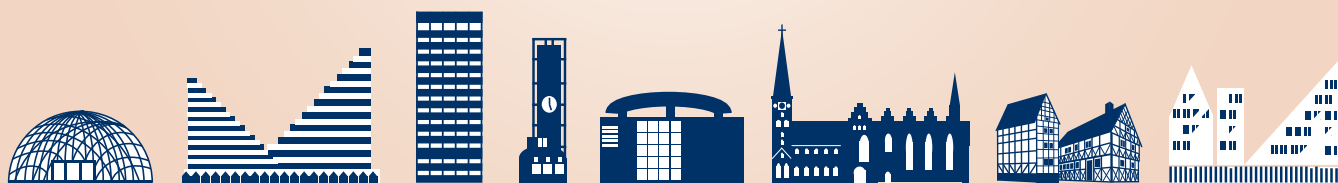
Figur 3. Binding af ikke-naturlige oligosaccharider til human galectin-3.

LabDays 2023

- trade fair for laboratory technology

AARHUS 13 - 14 SEPTEMBER

Be inspired – FREE to attend
Two days of inspiration, networking,
and products you can touch



PRINT FREE
ENTRANCE CARD

labdays.dk