

Fast and Tight Boronate Formation for Click Bioorthogonal Conjugation

BURCIN AKGUN AND DENNIS G. HALL

Angew. Chem. Int. Ed. 2016
doi: 10.1002/anie.201510321

Szakál Zsuzsanna
Csoportgyűlés,
2016.03.22.

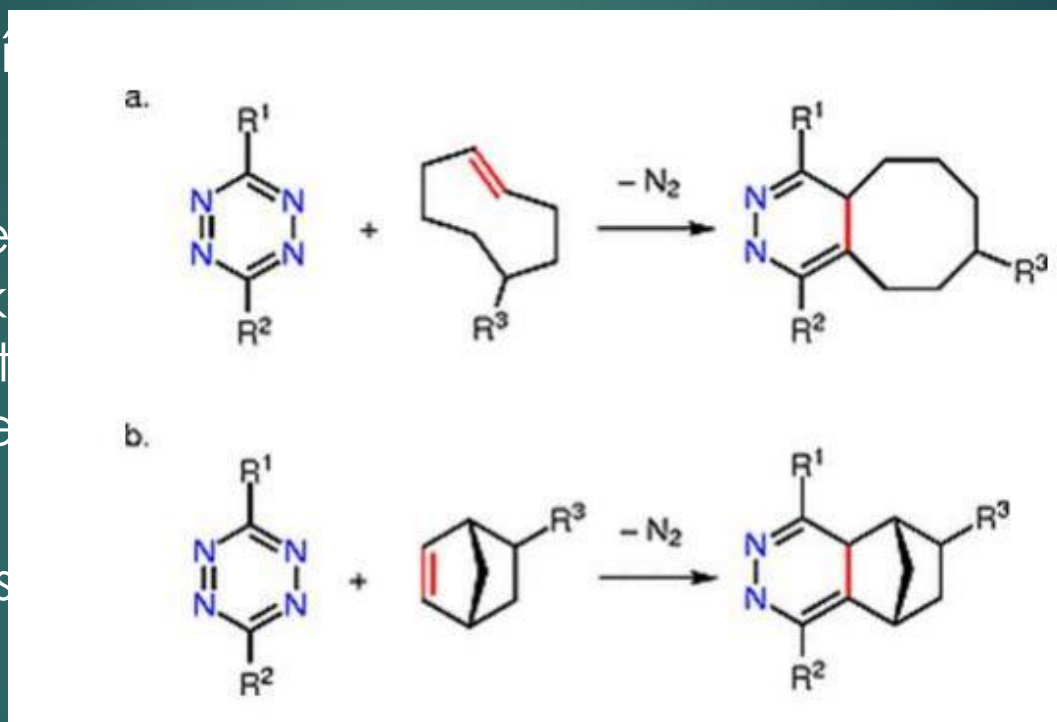
Bioortogonalitás

- ▶ Bio: Biológiai rendszerekkel kompatibilis
- ▶ Ortogonalitás: Kizárólag egymással reagáló funkciókat tartalmaz, nincs keresztreakció
- ▶ Biológiai folyamatok követése (nehezen vagy nem detektálhatók)
- ▶ Gyors, kvázi „kvantitatív” reakciók

Klikk-reakciók

3

- ▶ Szelektív
- ▶ Kiseb
- ▶ Követe
- ▶ termék
- ▶ mellékt
- ▶ könnye
- ▶ stb.
- ▶ Pl. Diels



oil

g

Boronát biokonjugáció jellemzői és mellőzésének okai

- ▶ Egyszerűség
- ▶ Bioortogonalitás
- ▶ Gyors
- ▶ Reverzibilitás



- ▶ Nem egyértelmű a mechanizmus
- ▶ Átfogó kinetikus adatok hiánya (K_{EQ} , K_{ON} , K_{OFF}) vizes közegben



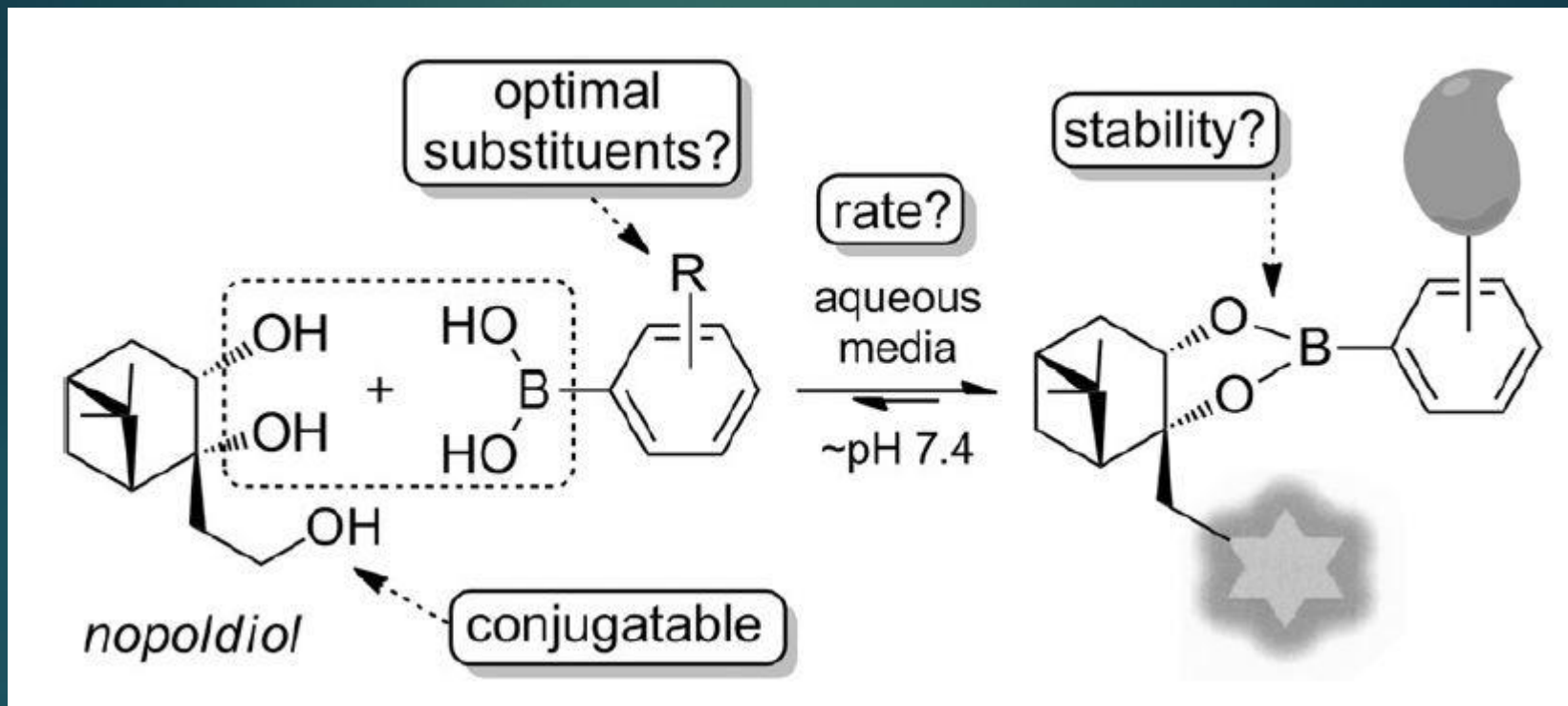
- ▶ Ezeket tudva lehetőség lenne az optimalizálásra a diol és a boronsav származék oldaláról is

Boronsav-észter kialakulása

- ▶ Kondenzáció \rightarrow nem előnyös (Le Chatelier)
- ▶ Gyűrűvé záródás a termodinamikai hajtóerő
- ▶ A pinanediol a legrobosztusabb boronsav-észter

Boronsav-észter kialakulása

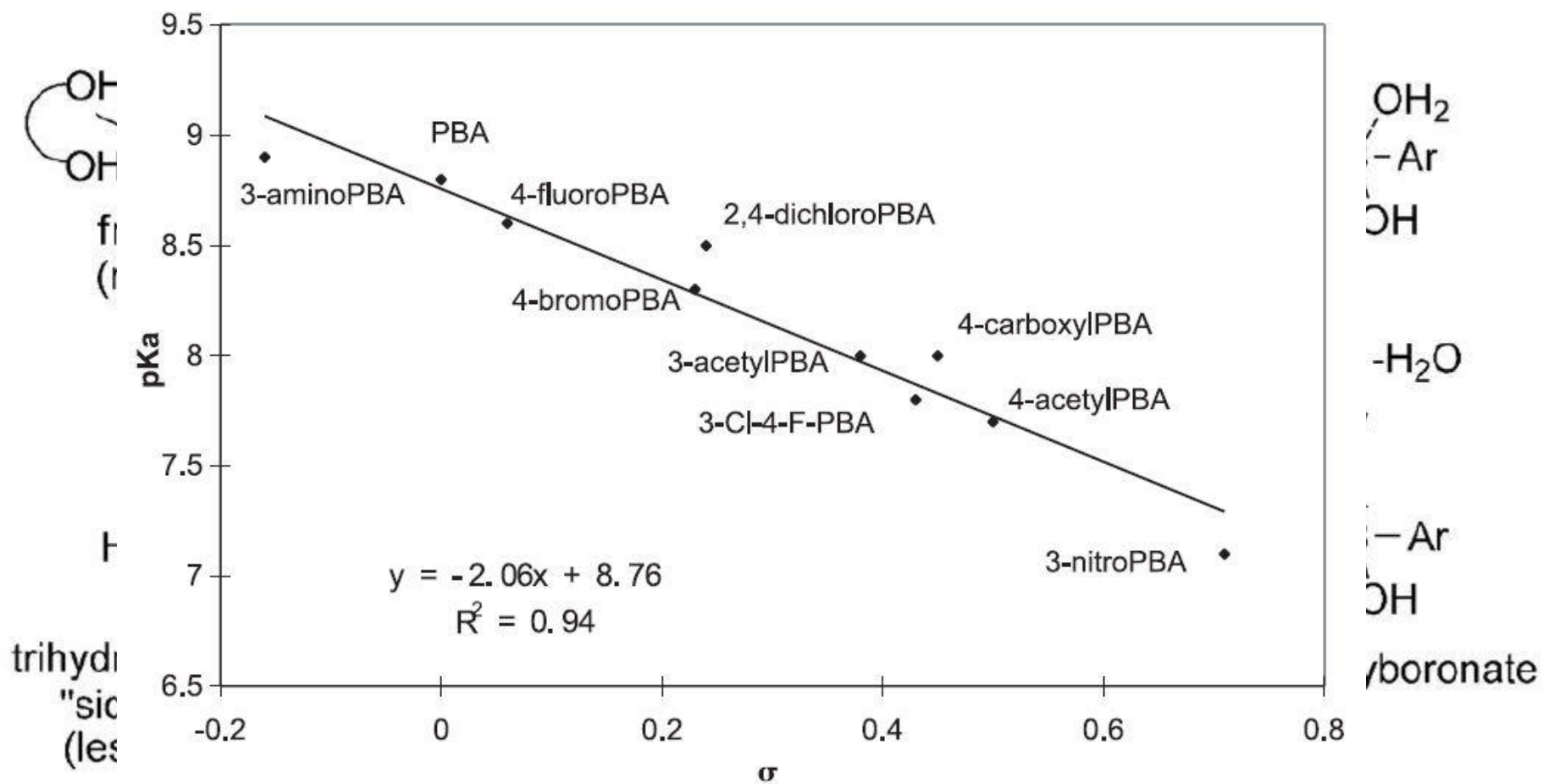
6



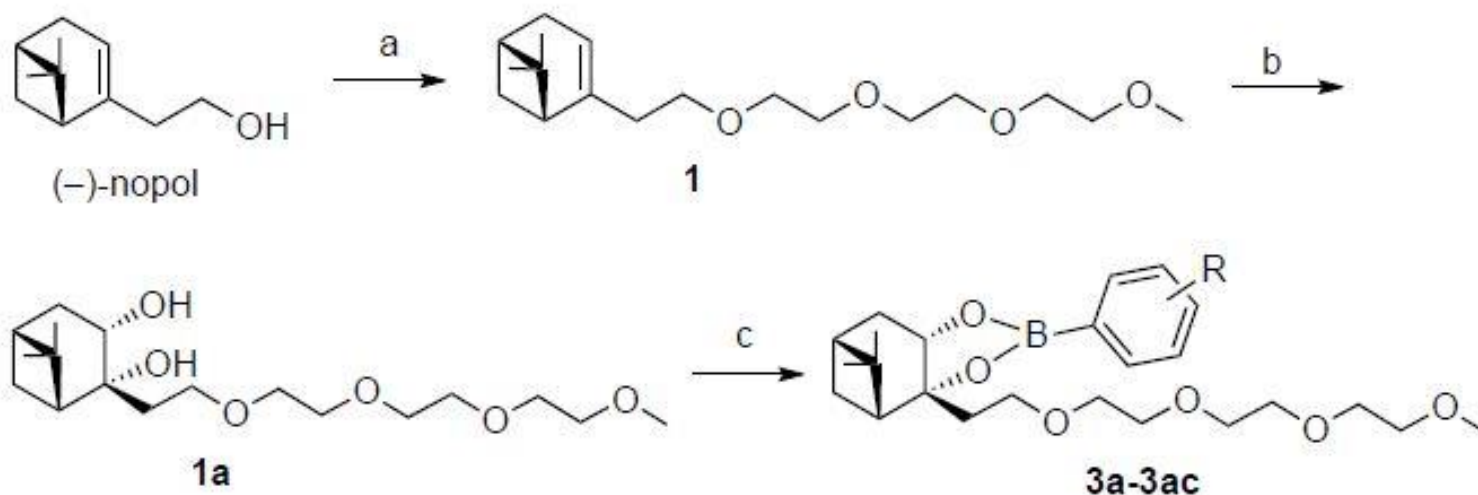
- ▶ Nincs információ: vizes közegű stabilitásáról, reverzibilitásról, strukturális adatairól (sztérikus, elektromos)
- ▶ Egy pinanediol származék, nopoldiol a megfelelő boronsav partner

Boronsav-észter kialakulása

7



► Modell: nopol-PEG-diol



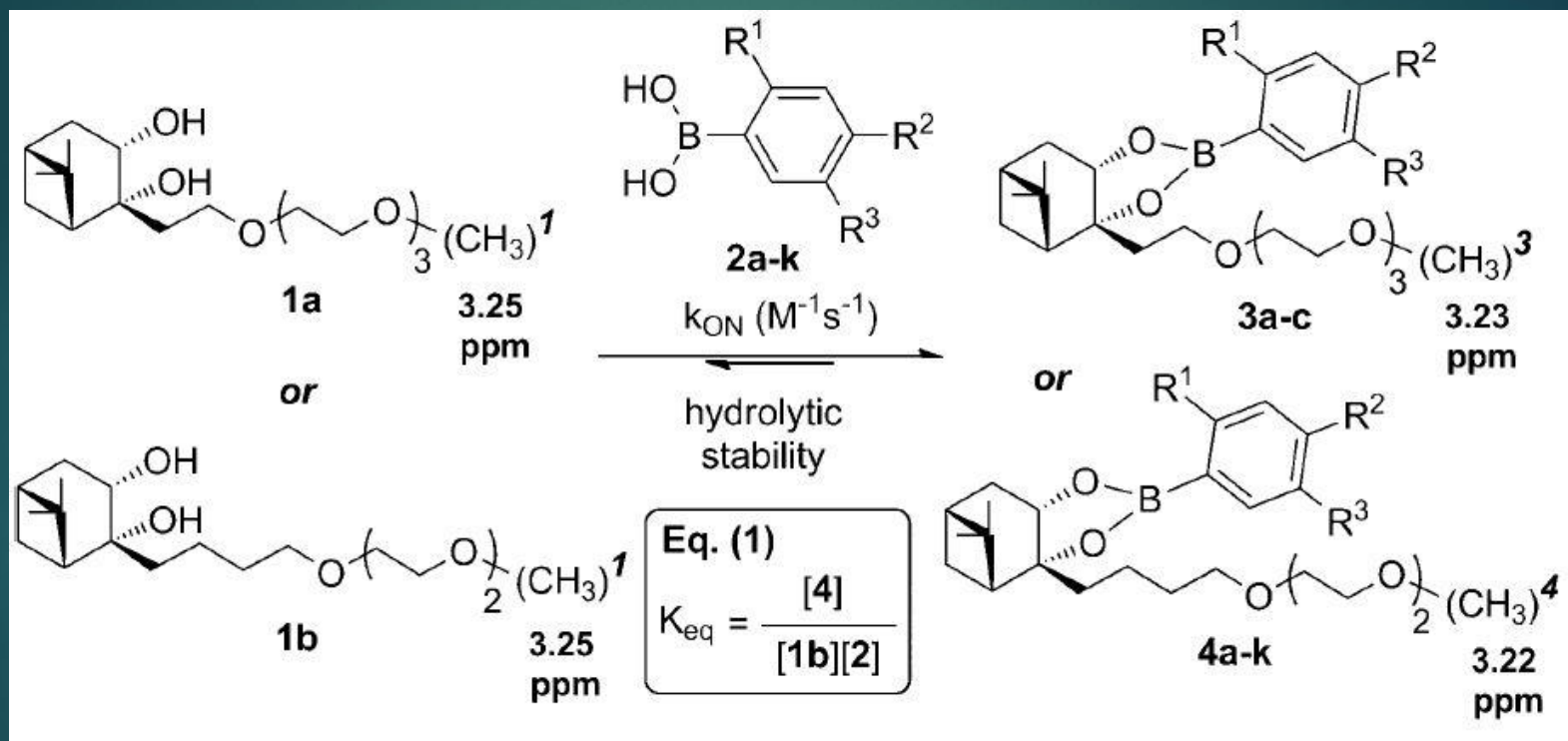
Scheme S1: Synthesis of (-)-nopol-PEG-diol-1 (**1a**) and its boronates (**3a – 3ac**).
Reaction conditions: (a) 1) Tosyl chloride, pyridine, 0 °C to rt, 4 h. 2) NaH, TBAI, triethylene glycol monomethyl ether, THF, 0 °C to rt, 16 h, 13% yield over two steps. (b) $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$, 2,6-lutidine, NMO (50%), IPA- H_2O , 95 °C, 24 h, 93% yield. (c) Arylboronic acid, THF, rt, 30 min.

Optimalizáció

- ▶ ^1H -NMR spektroszkópia
- ▶ Probléma:
 - a gyors reakciók kevésbé detektálhatók kis koncentrációban
 - A reakció elejét (~40 s) nem lehet felvenni
 - alulbecslést ad
- ▶ Eredmény:
 - ortometil és izopropil csoport növeli a stabilitást és csökkentik a sebességet
 - elektronszívócsoporthoz növelték a sebességet (savasság), csökkentették a stabilitást
 - reakció meghat. lépés: első OH^- csere

Optimalizáció

10



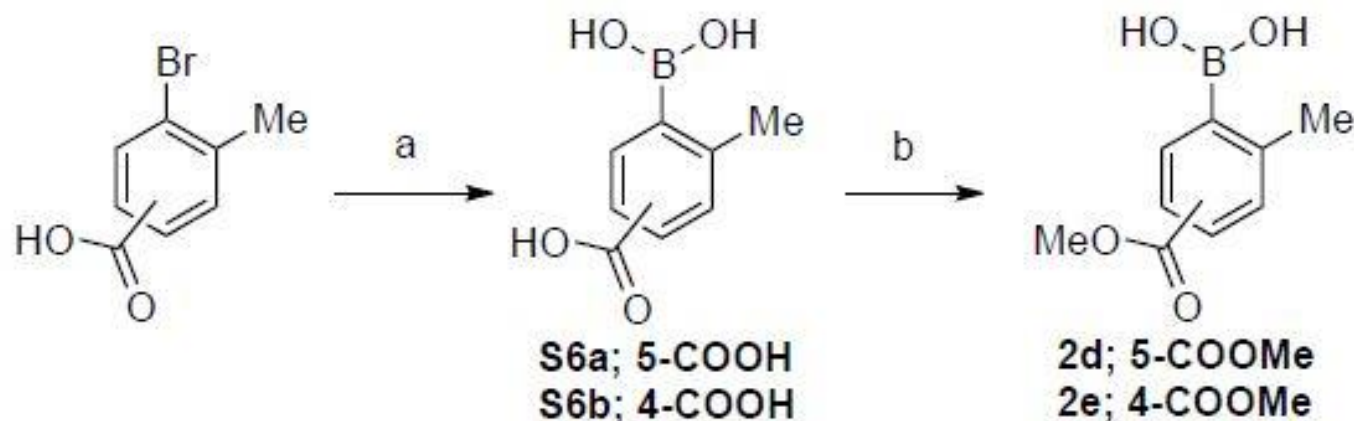
1a vagy 1b(1 equiv, 1 mM), 0,05M D₂O, foszfát puffer(pH=7,4)

Optimalizáció

11

Entry (1a/b)	2a-k: R ¹ , R ² , R ³	Hydrolytic stability ^[b] (3/1a or 4/1b)	K _{eq} × 10 ³ [M ⁻¹] ^[c]	k _{ON} [M ⁻¹ s ⁻¹] ^[d]
1 (1a)	2a: Me, H, H	3a/1a: 87:13	–	1.6 ± 0.1
2 (1a)	2b: F, H, H	3b/1a: 78:22	–	18 ± 4
3 (1a)	2c: CN, H, H	3c/1a: 70:30	–	> 50 ^[e]
4 (1b)	2a: Me, H, H	4a/1b: 93:7	180	2.3 ± 0.2
5 (1b)	2b: F, H, H	4b/1b: 84:16	27	33 ± 2
6 (1b)	2c: CN, H, H	4c/1b: 83:17	25	> 50 ^[f]
7 (1b)	2d: Me, H, CO ₂ Me	4d/1b: 91:9	120	6.9 ± 0.6
8 (1b)	2e: Me, CO ₂ Me, H	4e/1b: 90:10	91	7.8 ± 0.7
9 (1b)	2f: Me, H, OMe	4f/1b: 92:8	130	3.3 ± 0.6
10 (1b)	2g: Me, OMe, H	4g/1b: 94:6	330	1.0 ± 0.2
11 (1b)	2h: F, H, CONMe ₂	4h/1b: 75:25	15	> 50 ^[f]
12 (1b)	2i: F, H, OMe	4i/1b: 82:18	25	> 50 ^[f]
13 (1b)	2j: F, OMe, H	4j/1b: 85:15	40	18 ± 1
14 (1b)	2k: CN, H, CO ₂ Me	4k/1b: 78:22	12	> 50 ^[f]

- ▶ 1a diol reakció 3 lehetséges boronsavat adott (2a-c)
- ▶ 1b diol megerősítette, hogy a 2a-c a legjobbak
- ▶ H-NMR vizsgálat a 2a-c származékaira
- ▶ Eredmény:
 - para/meta pozícióban elektronszívó csop. kevésbé stabilis, nagy reaktivitás
 - elektron donor csoport növeli a stabilitást
- ▶ 2d: kiváló stab., nagy reaktivitás, könnyű szintézis
- ▶ 2h: további vizsgálat, de esélyes

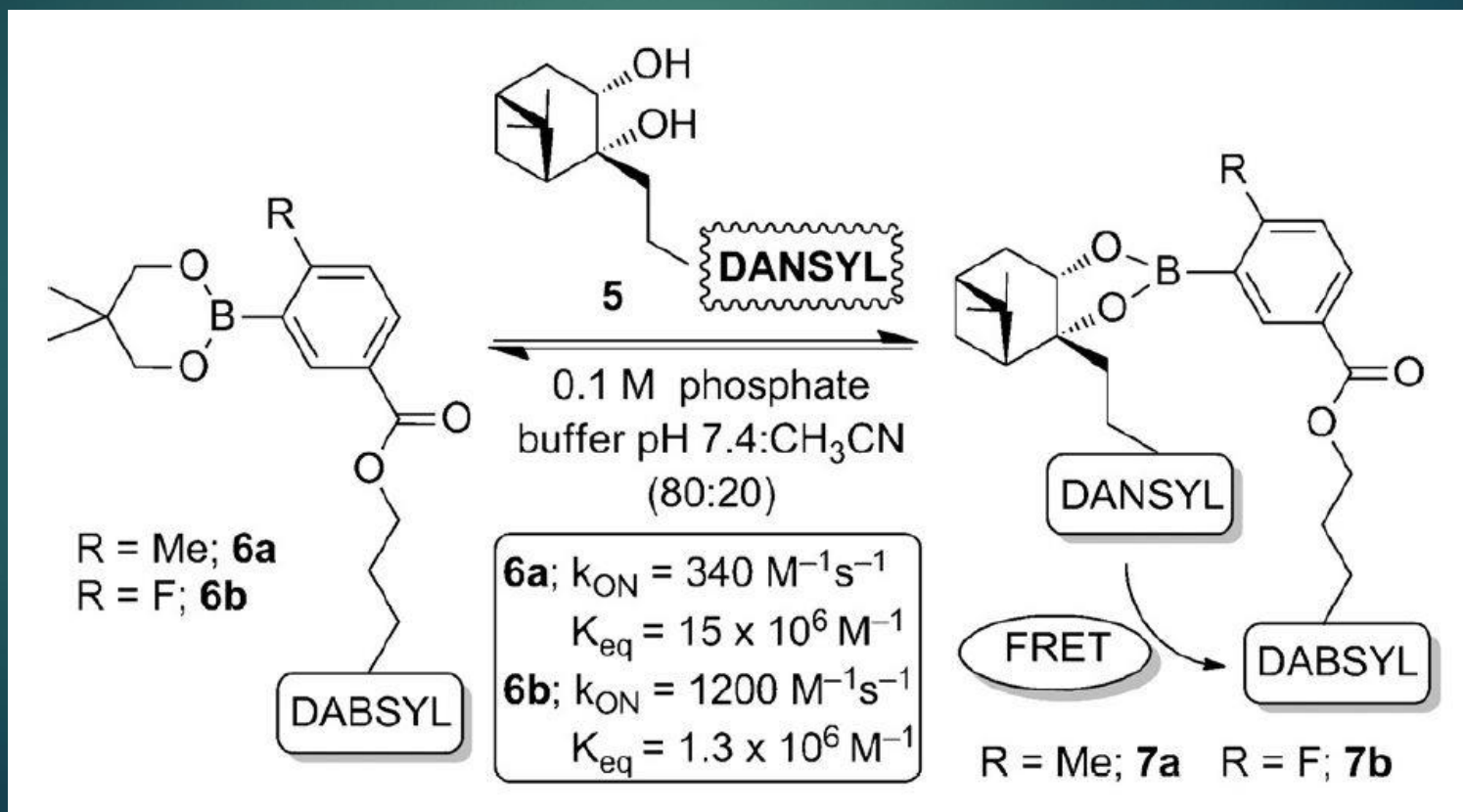


Scheme S5: Synthesis of 4/5-carboxy-2-methyl phenylboronic acid (**S6a** – **S6b**) and their methyl ester derivatives (**2d** – **2e**).^[1] Reaction conditions: (a) 1) n-BuLi, dry THF, –100 °C, 1 h. 2) Trimethyl borate, 1 h at –100 °C, then 16 h at rt. (b) 12 N H₂SO₄, MeOH, 16 h, rt.

Fluorospektroszkópiás vizsgálat

13

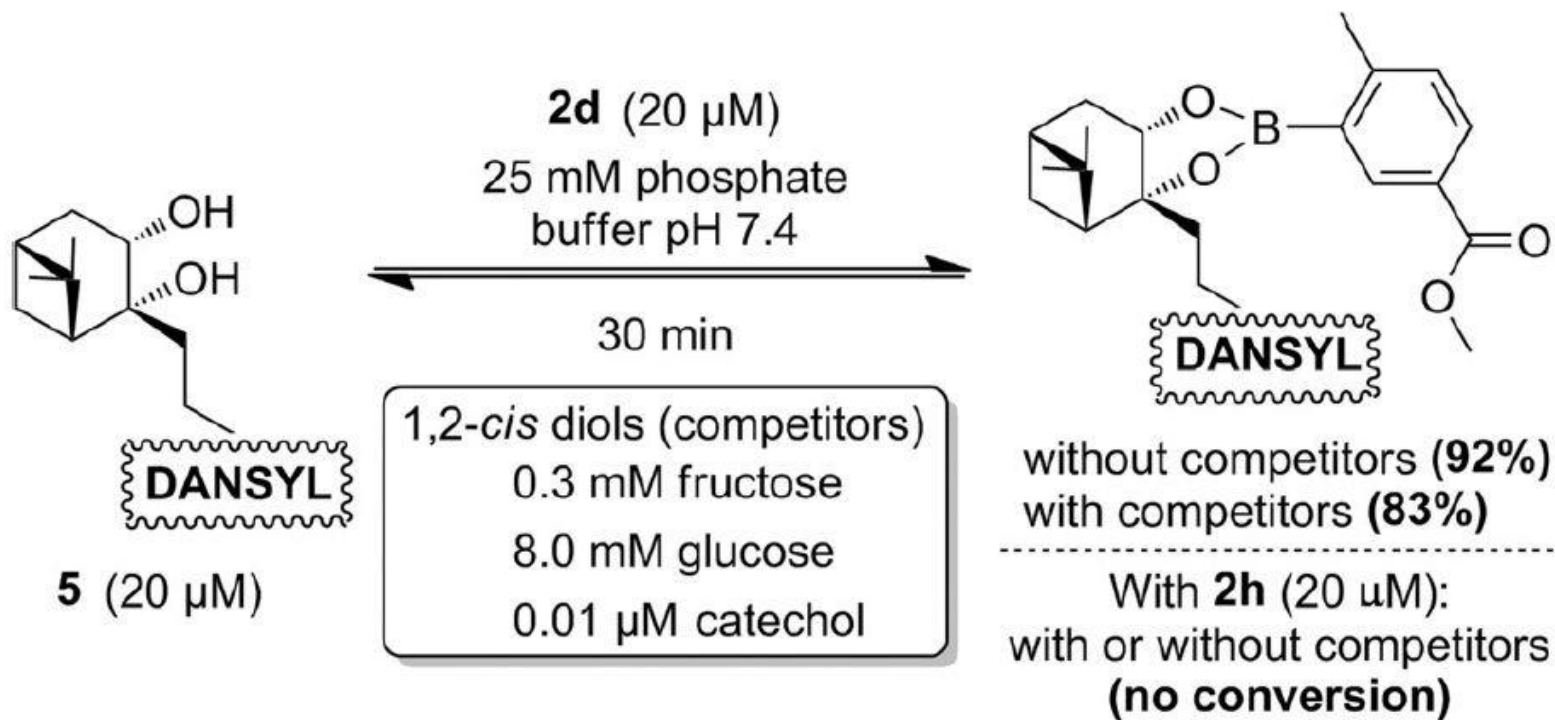
- ▶ A reakciósebességük összehasonlítása miatt
- ▶ Sokkal gyorsabb reakcióseb. -> az NMR alulbecslés volt
- ▶ Hasonló egyensúlybeállási idő



Biológiai próba

14

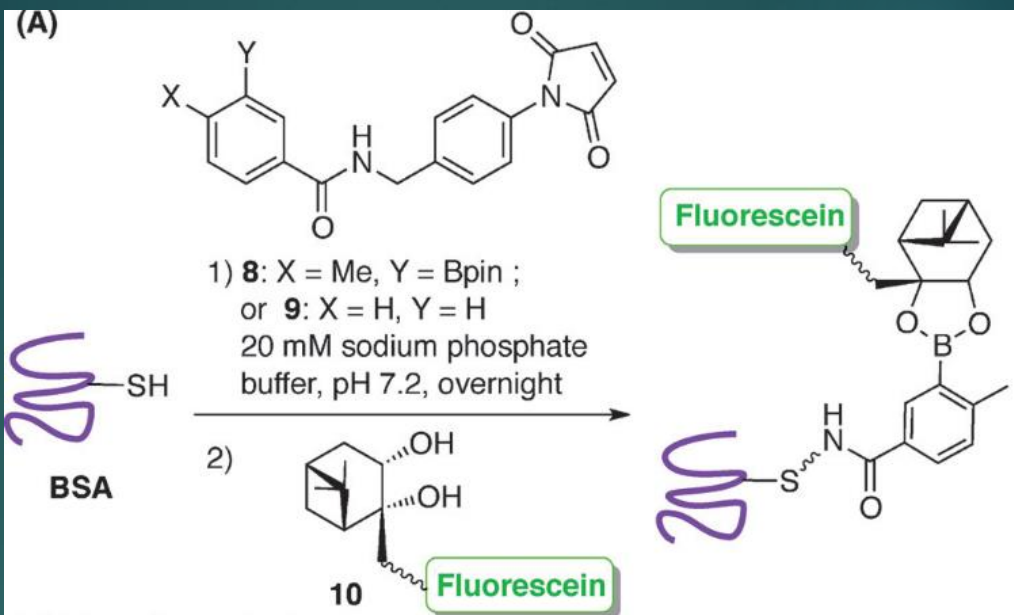
- ▶ Poliol környezet(vér)
- ▶ 5 diolt használták + 2d, 2h boronsavszármazék
- ▶ HPLC kiértékelés



Modellezés fehérjével

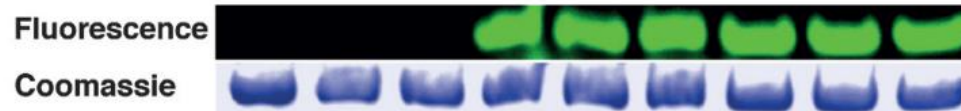
15

- ▶ BSA- 1 szabad cisztein \rightarrow bórsav-BSA addukt
- ▶ Fluoreszcenciával jelzett nopoldiol(10)
- ▶ Gélelektroforézis és gélfuoreszcencia
- ▶ Ha bórsav „fej” nélküli maleimidet használtak
nincs reakció



(B) Time dependent

Reaction time (min)	120	120	120	5	15	30	60	90	120
8 (100 μ M)	-	+	-	+	+	+	+	+	+
10 (100 μ M)	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9 (100 μ M)	-	-	+	-	-	-	-	-	-



(C) Dose dependent

8 (μ M)	-	100	-	20	40	60	80	100	100
10 (μ M)	100	-	100	20	40	60	80	100	200
9 (μ M)	-	-	100	-	-	-	-	-	-

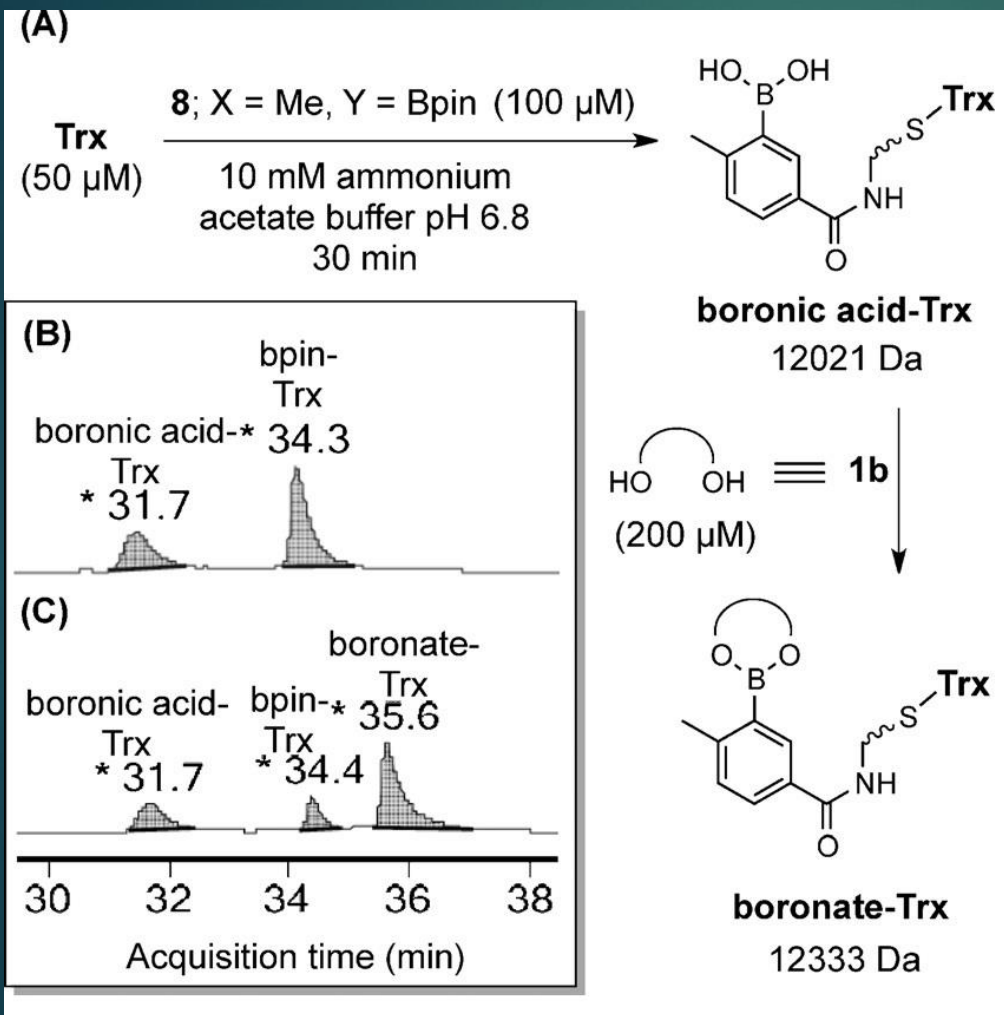


(D)

100
200
-

Modellezés fehérjével II.

17



- ▶ Thioredoxin – 1 diszulfid csoport – egy éjszakás TLEP redukció
- ▶ NH_4Ac puffer, 30 perc, boronil-tartalmú maleimid, 1 b diol
- ▶ HPLC, LC-MS
- ▶ >50%-ban létrejött biokonjugáció
- ▶ Fetal-bovin szérumban is lezajlott

Ortogonalitás

18

- ▶ Ösztett fehérjekeverékben
- ▶ Bórsax-Trx addukt + dansil-kötődésű 1b diol
- ▶ LC-MS és HPLC fluoreszcencia
- ▶ 83% átalakulás

Összefoglalás

- ▶ Klikk-bioortogonális rendszer
- ▶ Gyors, könnyű szintézis, mikromól alatti disszociációs állandó, vizes közeg
- ▶ Reakciósebesség nagyobb, nagy K_{eq} , fiziológias környezetben is tudnak reagálni fehérjével
- ▶ Reverzibilis
- ▶ Kitekintés: affinitás alapú tisztítás, felszíni kötés, anyagtudományok

Köszönöm a figyelmet!