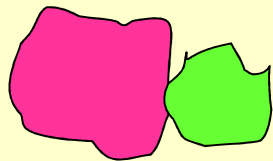


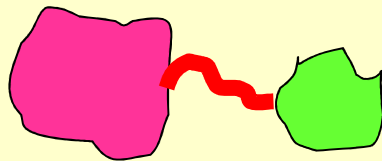
Biokonjugační reakce

- spojení dvou biomolekul - vyžaduje činidla, která dokáží spojit přímo dvě různé nebo shodné povrchové skupiny na obou různých molekulách
- **přímé spojení** biomolekul bez přítomnosti nějaké můstkové spojovací struktury - **zero length crosslinkers**

karbodiimidy, karbonyldiimidazol,
aldehyd + aminoskupina



- včlenění se **spojovací můstek** požadované definované délky tzv. **linker** – bifunkční činidla

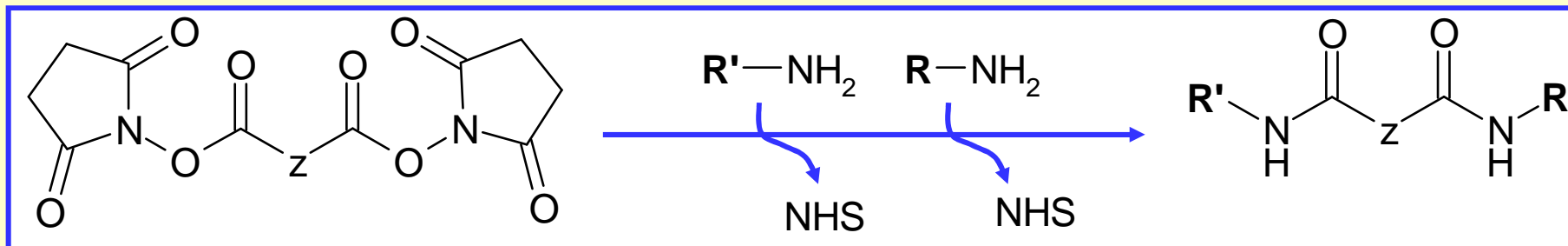


Homobifunkční síťující činidla

- **symetrická činidla**, co mají **dvě shodné reaktivní skupiny**
- činidlo se spojí jedním koncem s biomolekuly A
- druhý konec se spojí s biomolekulou B
- vznikne **A-B konjugát** (to je žádaný produkt)
 - nežádoucí produkty: A-A, B-B, oligomerní A_xB_y , prokřížení skupin v rámci jedné molekuly A (nebo B)
- průběh je málo definovaný
- provádění reakce
 - jedнокrokově – vše se smíchá dohromady – pak vznikají často oligomerní, případně i precipitující produkty
 - nejprve biomolekulu A smíchat s konjugačním činidlem a nechat proběhnout její modifikaci, odstranit nadbytek činidla (např. dialýzou) a pak přidat druhou biomolekulu B
- komplikace - nestabilita reaktivních skupin ve vodném prostředí
 - mimo konjugaci probíhá i hydrolýza
- přes uváděné nedostatky se běžně a úspěšně využívají

Homobifunkční NHS estery

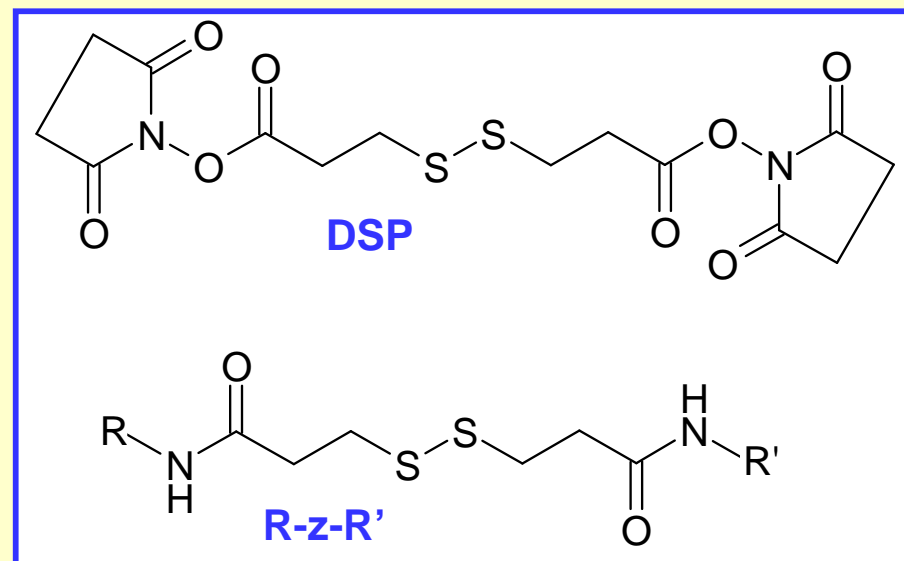
- karboxylové skupiny aktivované N-hydroxysukcinimidovou skupinou (NHS) (nebo sulfo-NHS) - velmi reaktivní vůči nukleofilním -NH_2
- obecná struktura **NHS-z-NHS**, z značí střední část = spojovací můstek:



- dithiobis(sukcinimidylpropionát) (DSP nebo DTSP)**, Lomantovo činidlo, $z = 1,2 \text{ nm}$, disulfidové uskupení může být rozštěpeno pomocí DTT nebo merkaptoethanolu

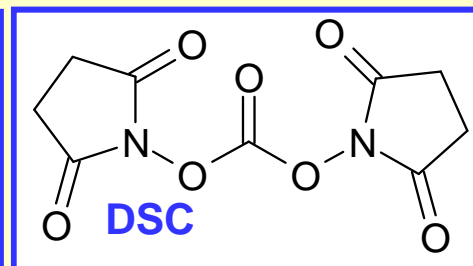
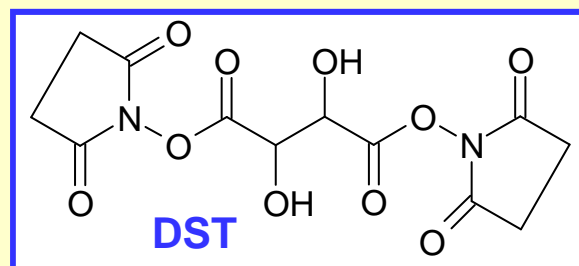
- sulfonovaná varianta:
3,3'-dithiobis(sulfosukcinimidyl propionát) (DTSSP)
- rozpustný ve vodě

- DSP a vznikající produkt:



Další NHS bifunkční činidla

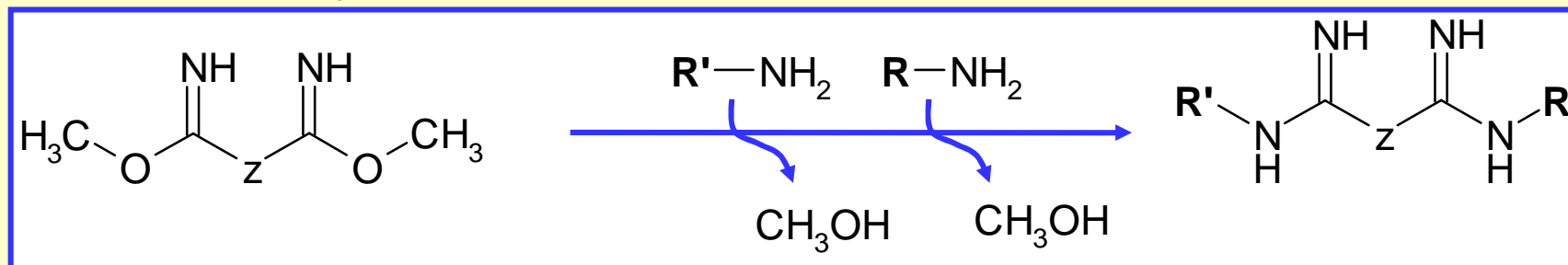
- disukcinimidylsuberát (**DSS**), C8 alifatický můstek, $z = 1,14$ nm
 - existuje sulfovarianta bis(sulfosukcinimidyl)suberát (**BS³**)
 - hydrofilní **BS³** je výhodný k prokřížení (bílkovinných) komplexů na povrchu buněk - činidlo neprochází buněčnou membránou
 - kratší C5 můstek, $z = 0,77$ nm, poskytuje disukcinimidylglutarát (**DSG**)



- disukcinimidyltartrát (**DST**) vytváří kratší můstek o délce 0,64 nm
 - přítomnost dvou hydroxylů uprostřed můstku umožňuje rozštěpit spojení použitím mírné oxidace jodistanem
- nejkratší spojení vytvoří **N,N'-disukcinimidylkarbonátu (DSC)**
 - spojením vzniká substituovaný derivát močoviny, vůči nukleofilům je extrémně reaktivní
 - nelze použít ve vodném prostředí, hydrolýzou vzniká CO_2 a 2 NHS
 - pro derivatizaci polyethylenglykolů - spojí hydroxy a aminoskupinu za vzniku karbamátového uskupení
 - napřed se v nevodném prostředí aktivuje PEG, ten pak může ve vodném prostředí reagovat s proteiny (pegylace)

Homobifunkční imidoestery

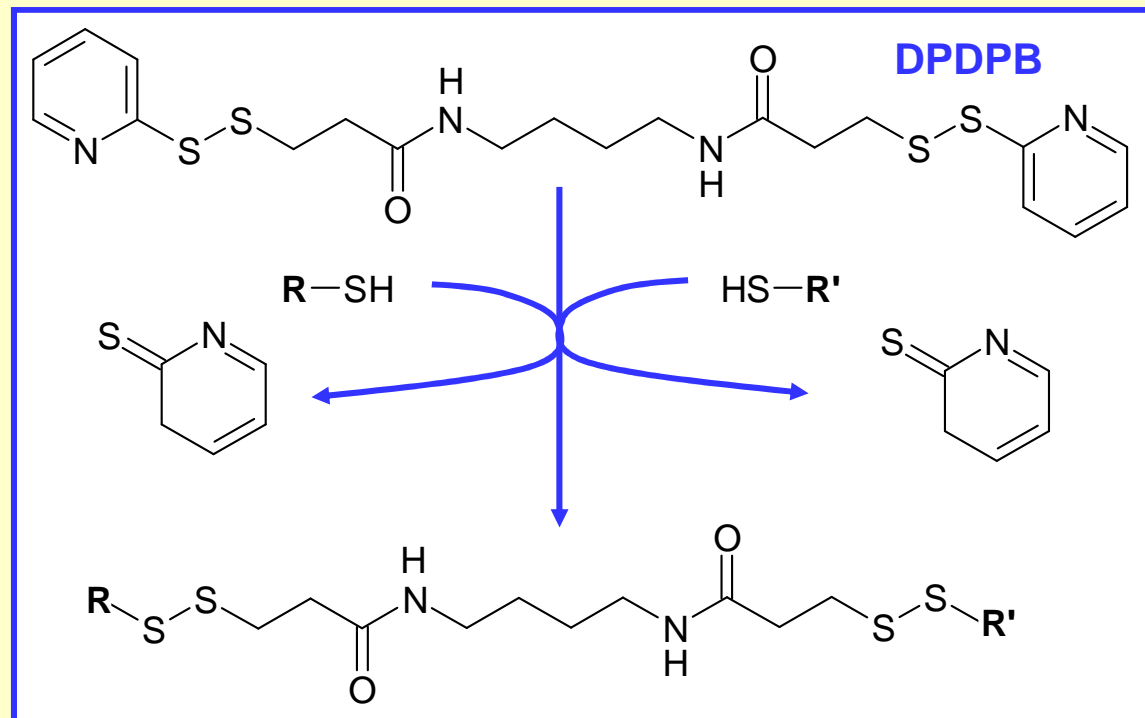
- imidoesterová (jinak imidátová) skupina ve vodném prostředí reaguje s aminoskupinou za vzniku imidoamidu (amidinu)
 - činidlo i produkt jsou ve vodném prostředí protonovány na imidovém dusíku, tedy dobře rozpustné



- amidinová vazba je stabilní v mírně kyselém prostředí, při vyšším pH může hydrolyzovat
- činidla jsou na bázi **imidoderivátů dikarboxylových kyselin**:
 - dimethyl adipimidát (**DMA**, C6 z = 0,86 nm)
 - dimethyl pimelimidát (**DMP**, C7 z = 0,92 nm)
 - dimethyl suberimidát (**DMS**, C8 z = 1,1 nm)
- **DMP** stabilizuje komplexy protilátek s proteinem A
- dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidát (**DTBP**) obsahuje uprostřed disulfidové spojení (z = 1,19 nm)
 - může být případně rozštěpen DTT

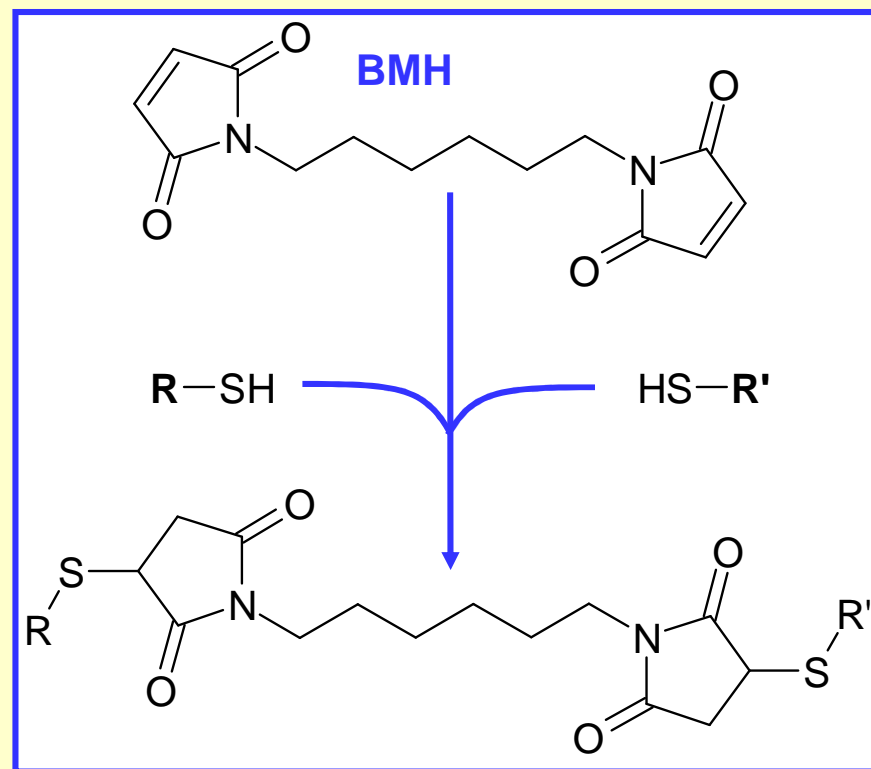
Homobifunkční činidla spojující -SH skupiny

- dvě skupiny podle stability vznikajícího spojení:
 - disulfidová vazba - spojení lze snadno rozrušit pomocí oxidačních činidel
 - thioetherová vazba - spojení trvanlivé
- 1,4 di-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] butan (**DPDPB**)
 - reverzibilní spojení biomolekul, $z = 1,6$ nm, 14 atom. řetězec
 - odštěpovaný pyridin-2-thion lze sledovat při 343 nm
 - pro vytváření konjugátů redukováných molekul protilátek s enzymy



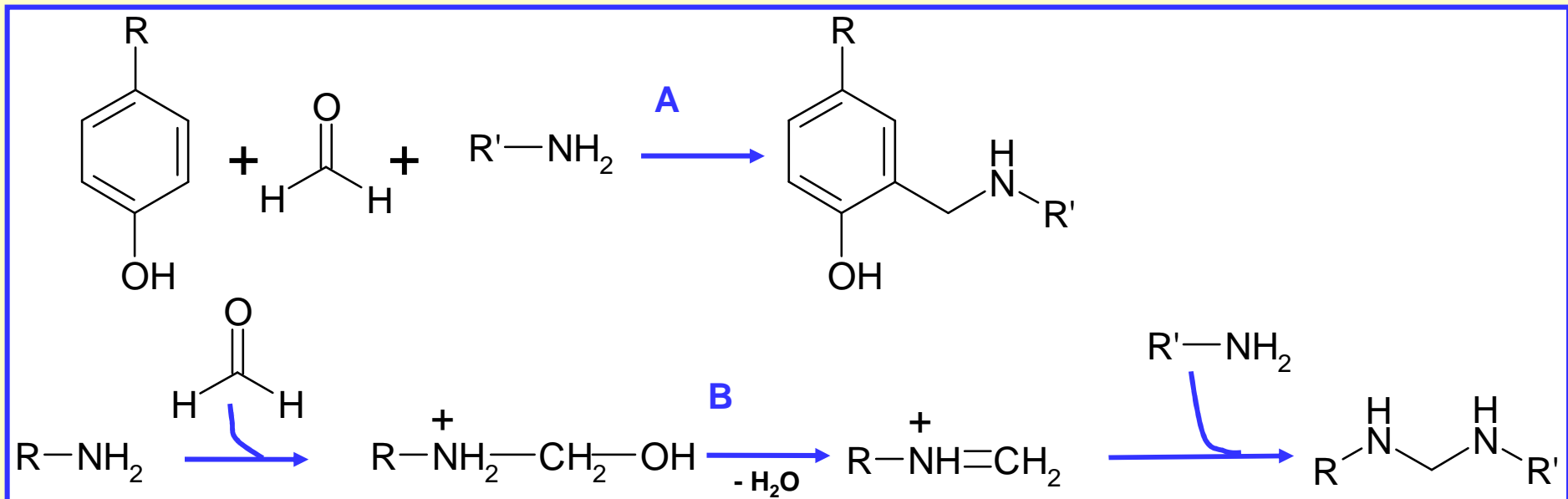
Thioetherové spojení

- bis(maleimido)hexan (**BMH**) reaguje v neutrálním prostředí za vzniku stabilního spojení ($z = 1,6$ nm)
- dochází k adici sulfhydrylových skupin na dvojně vazby v cyklu a vznikají tak stabilní thioetherové vazby
 - mechanismus vychází z použití N-ethylmaleimidu (NEM) jako inhibitoru cíleného na SH skupinu



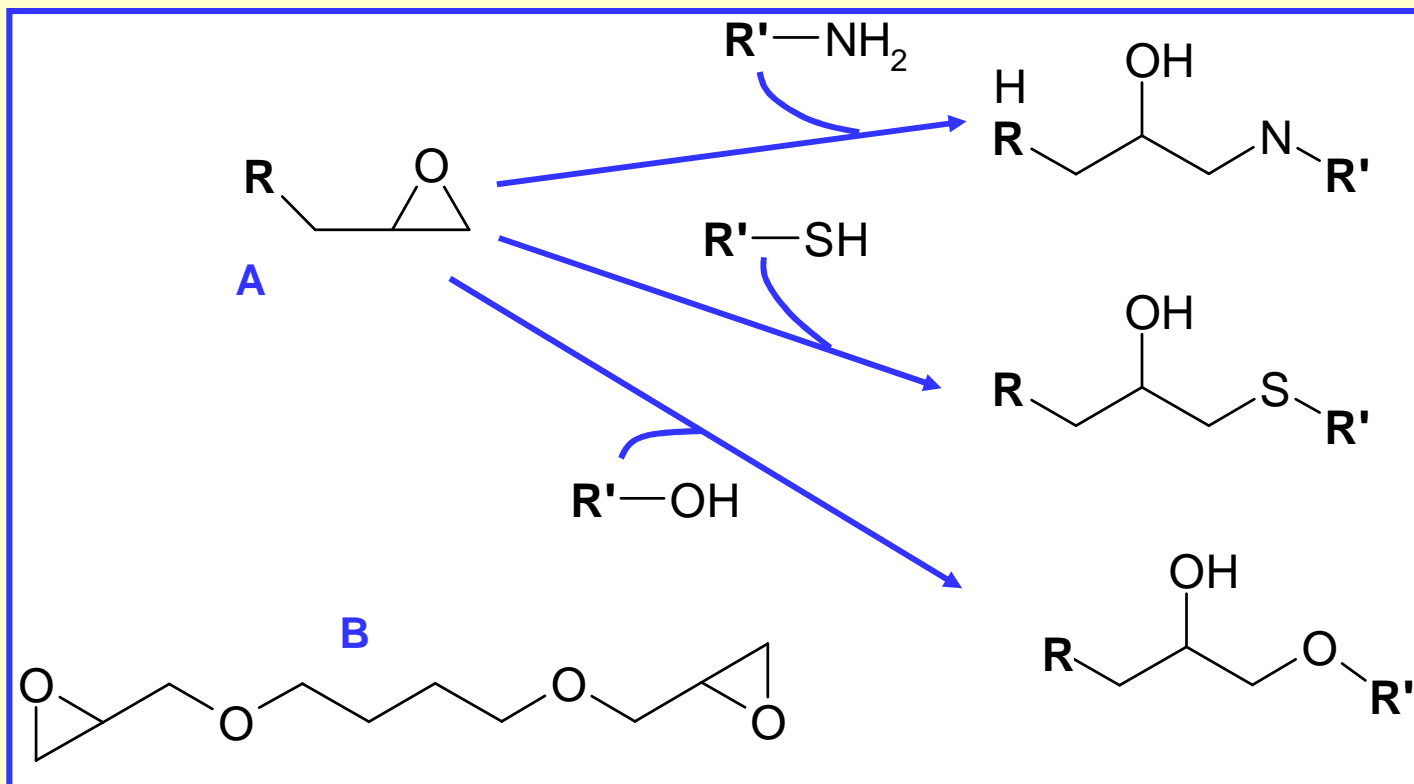
Homobifunkční aldehydy

- dříve zmíněný **glutaraldehyd**
- **formaldehyd** - nejkratší spojovací můstek, reaguje prostřednictvím
- **Mannichových kondenzací (A)**
 - spojuje sloučeniny s aktivovanými vodíky (např. na jádře fenolu v *ortho* a *para* polohách) s formaldehydem a dále s aminoskupinou
- **přes imoniový kationt s aminoskupinou (B)**
 - spontánně vznikne reaktivní imoniový kationt, který zreaguje s další aminoskupinou a dojde ke spojení přes C1 můstek



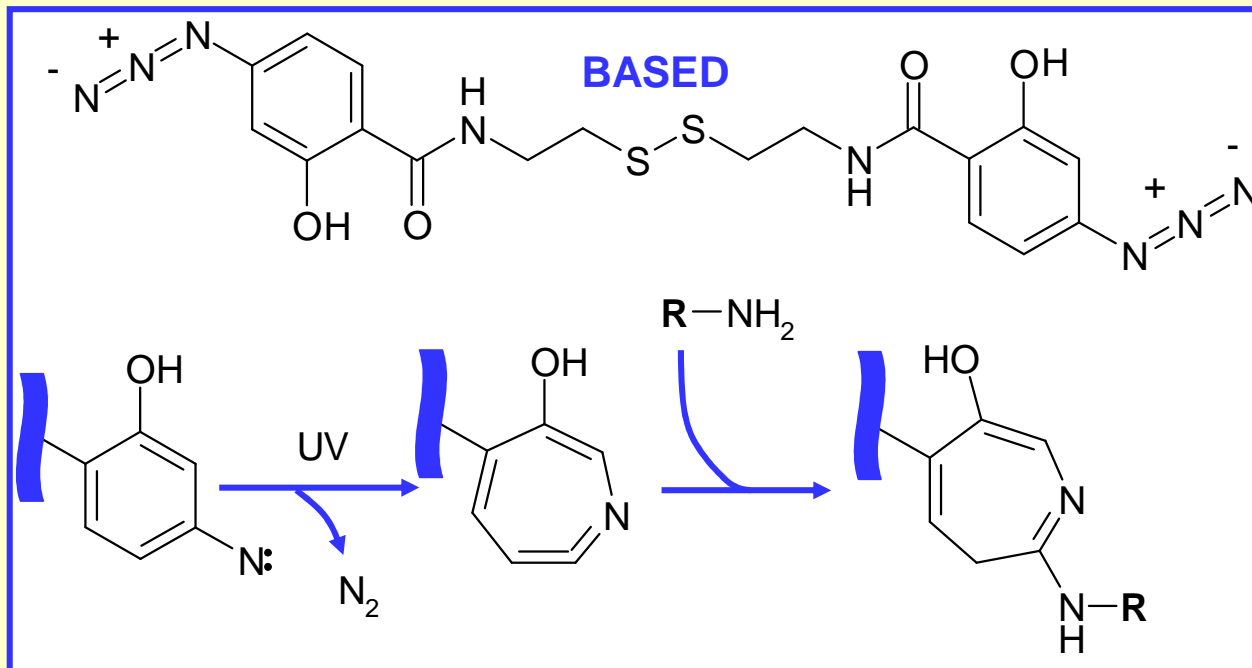
Bis-epoxidové sloučeniny

- jsou schopné spojovat biomolekuly obsahující nukleofilní skupiny včetně aminů, hydroxylů a sulfhydrylů
- dochází k otevření tříčlenného epoxidového kruhu (A)
- reakce probíhají v mírně alkalickém prostředí
- k aktivaci matric nesoucích hydroxylové skupiny (polysacharidy)
- nejznámějším činidlem je **1,4-butandiol diglycidylether (B)**



Fotoreaktivní crosslinkery

- bis[β -(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfid (**BASED**) je aktivován ozářením UV světlem (270 nm)
- uvolní se molekula dusíku a vznikne velmi reaktivní a nestálý **arylnitren** - rychle se přemění za rozšíření aromatického kruhu na **dehydroazepin**, ten následně reaguje s aminoskupinou biomolekuly



- derivát vzniklý po konjugaci obsahuje na 7-členném kruhu fenolický hydroxyl, který ho aktivuje např. pro elektrofilní značení radioaktivním jodem

další možnosti...

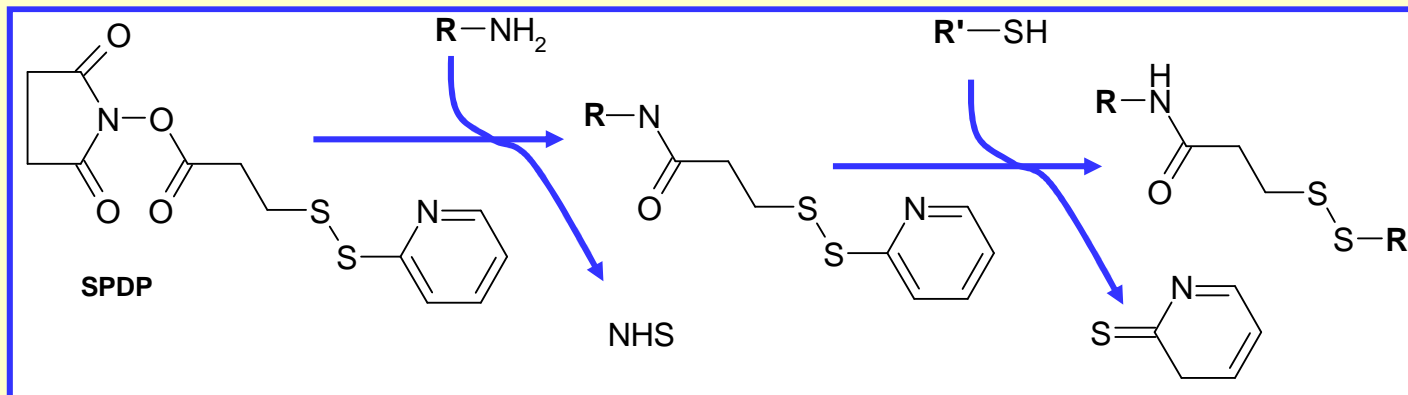
- aktivované vodíky na aromatickém jádře - diazoniové deriváty
- úspěšné spojení se projeví oranžovým nebo ještě tmavším zbarvením vzniklých konjugátů - charakteristické pro diazosloučeniny
- diazoniové sloučeniny se obvykle generují z příslušných diaminů - **o-tolidin** a **benzidin** (*p*-diaminodifenyl) - reakcí s NaNO_2 v slabě kyselém prostředí v chlazené reakční směsi
- vzniklá diazoniová sůl reaguje ochotně se zbytky tyrosinu a histidinu
-
- difluorbenzenové deriváty - atomy fluoru na vhodně aktivovaném aromatickém jádře (např. pomocí nitroskupin) reagují substitučně s aminoskupinami
 - mohou ale reagovat i jiné nukleofily
- dostupná činidla jsou 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen (**DFDNB**) nebo 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrodifenylsulfon (**DFDNPS**)

Heterobifunkční konjugační činidla

- obsahují **dvě různé reaktivní skupiny** - spojí se s různými funkčními skupinami konjugovaných biomolekul
- použití obvykle probíhá ve dvou nebo třech krocích
 - výrazně se omezuje množství oligomerních nebo polymerních produktů
 - činidlo je smícháno s první biomolekulou, kterou derivatizuje svou reaktivnější skupinou
 - nadbytek činidla je odstraněn (dialýza, gelová filtrace)
 - druhá reaktivní skupina je obvykle stabilnější a následně reaguje s druhou biomolekulou
- variabilita reaktivních skupin - lze lépe vybrat cílové místo
 - menší narušení důležitých aktivních míst (epitop antigenu, vazebné místo protilátky, aktivní místo enzymu ...)
- důležitá je i spojovací můstková část – **linker**
 - může být samozřejmě pasivní
 - může být cílem dalších reakcí, zejména se jedná o rozštěpení
 - význam pro zachování bioaktivity konjugátu má délka a polarita linkeru

Spojení -SH a -NH₂

- nejčastější vzhledem k běžné dostupnosti cílových skupin v bílkovinách
- pro aminoskupinu je v činidle nejčastěji přítomna NHS skupina v kombinaci s několika možnostmi pro SH skupiny
- N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionát (**SPDP**) poskytuje amidovou vazbu s biomolekulou nesoucí -NH₂ a disulfidovou vazbu s biomolekulou nesoucí -SH:



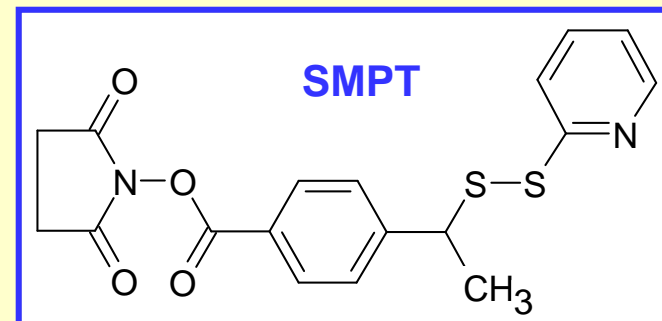
- pro SPDP je $z = 0,68$ nm
- s delším řetězcem ($z = 1,12$ nm) pod názvem **LC-SPDP** (long-chain)
- rozpustnější se sulfonovanou NHS skupinou – **Sulfo-LC-SPDP**

- **sukcinimidyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluen (SMPT)**

- můstek tvořený benzenovým jádrem a methylovou skupinou chránící disulfidovou skupinu (sterická zábrana ataku) zlepšuje trvanlivost konjugátů

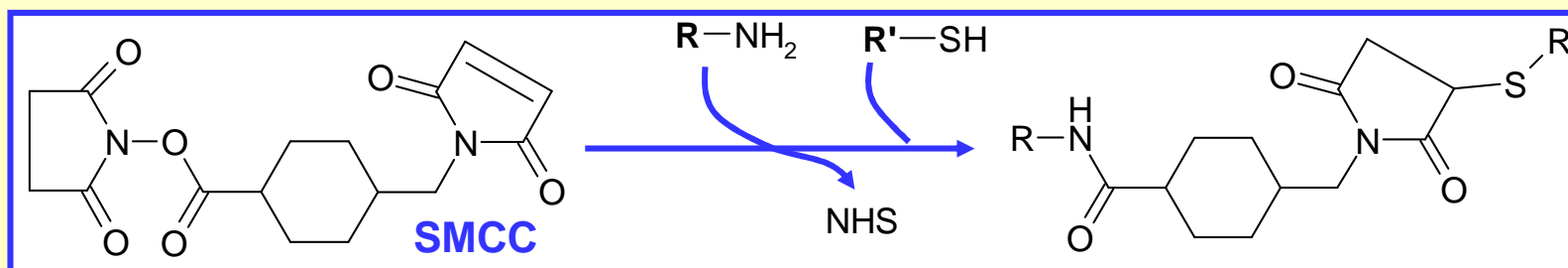
- analog **Sulfo-LC-SMPT**

- spojení biomolekul lze rozebrat v místě **-S-S-** vazby redukcí (např. DTT)



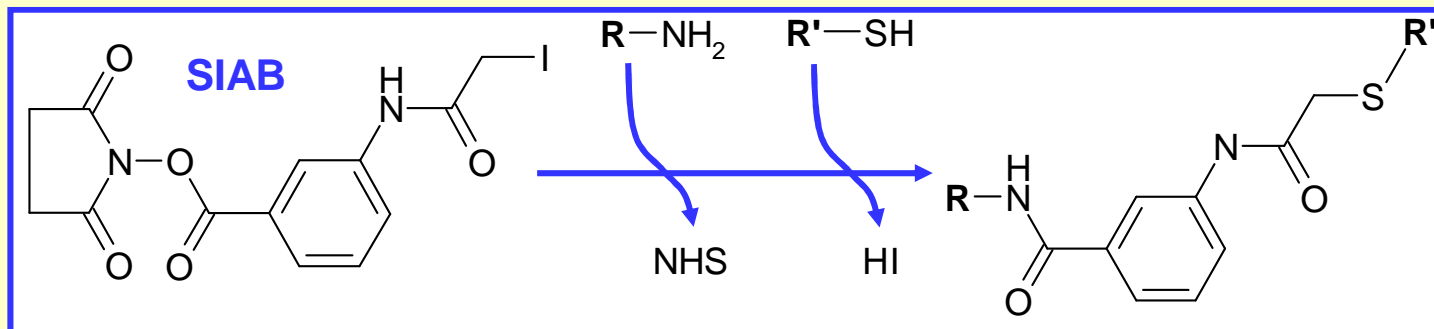
- „nerozebíratelné“ spoje používají pro SH skupinu maleimidovou nebo jodacetátovou reaktivní část

- sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-karboxylát (**SMCC**, $z = 1,16$ nm)



- další alternativní činidla: *m*-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidoester (**MBS**, 0,99 nm), sukcinimidyl-4-(*p*-maleimidofenyl)butyrát (**SMPB**, 1,45 nm) a N-(γ -maleimidobutyryloxy)-sukcinimidester (**GMBS**, 1,02 nm)

- N-sukcinimidyl(4-jodoacetyl)-aminobenzoátem (**SIAB**, 1,06 nm)

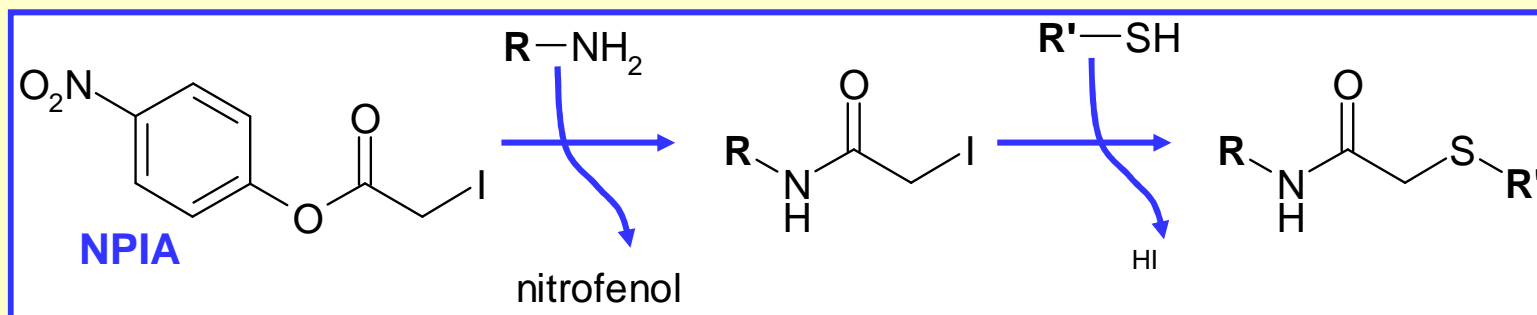


- alternativní činidla

- sukcinimidyl-6-[(jodoacetyl)-amino]hexanoát (**SIAX**)
- jeho varianta s můstkem prodlouženým o aminohexanovou kyselinu, tj. sukcinimidyl-6-[6-(((jodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoát (**SIAXX**)
- sukcinimidyl-4-(((jodoacetyl)amino)methyl)cyklohexan-1-karboxylát (**SIAC**) s analogem **SIACX** mají objemnější spojovací můstek

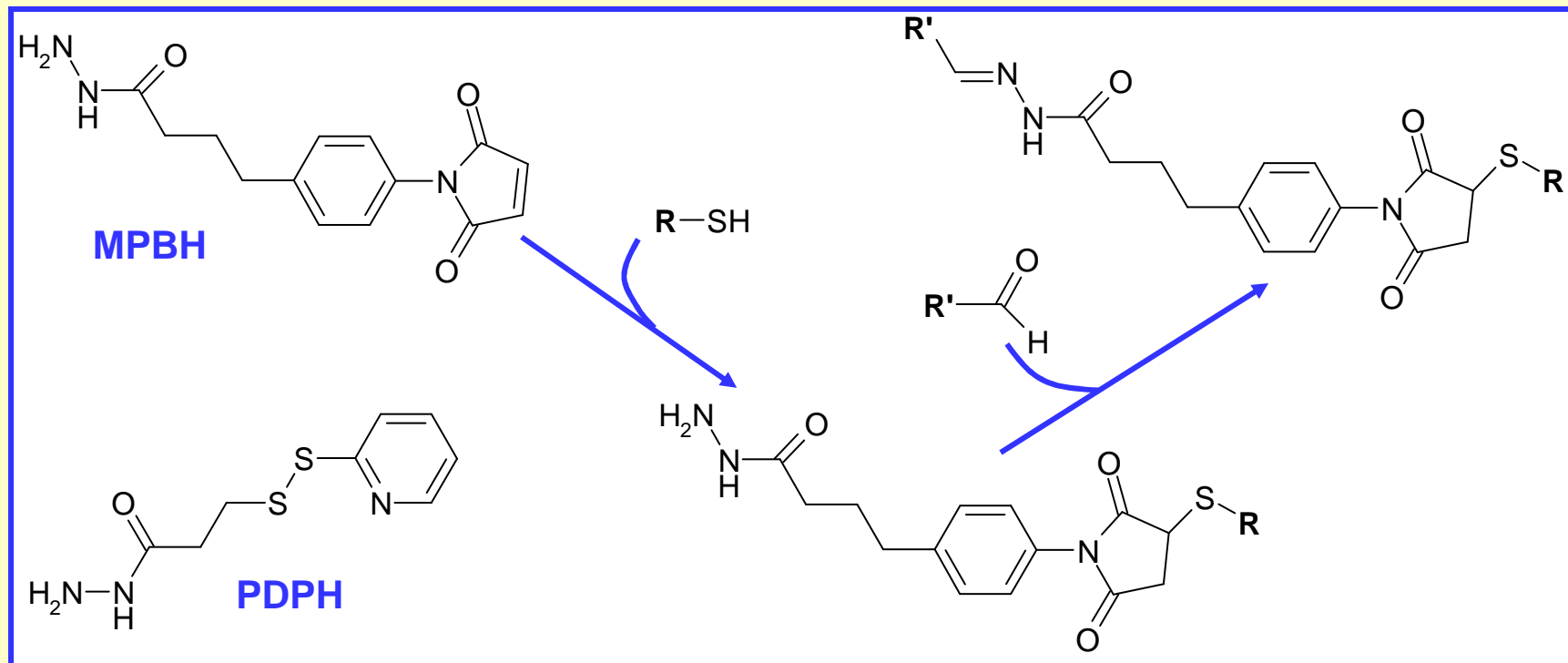
- *p*-nitrofenyljodo-acetát (**NPIA**) vůči $-NH_2$ reaguje podobně jako NHS, vzniká také amidová vazba

- výhodou může být krátké spojení mezi biomolekulami



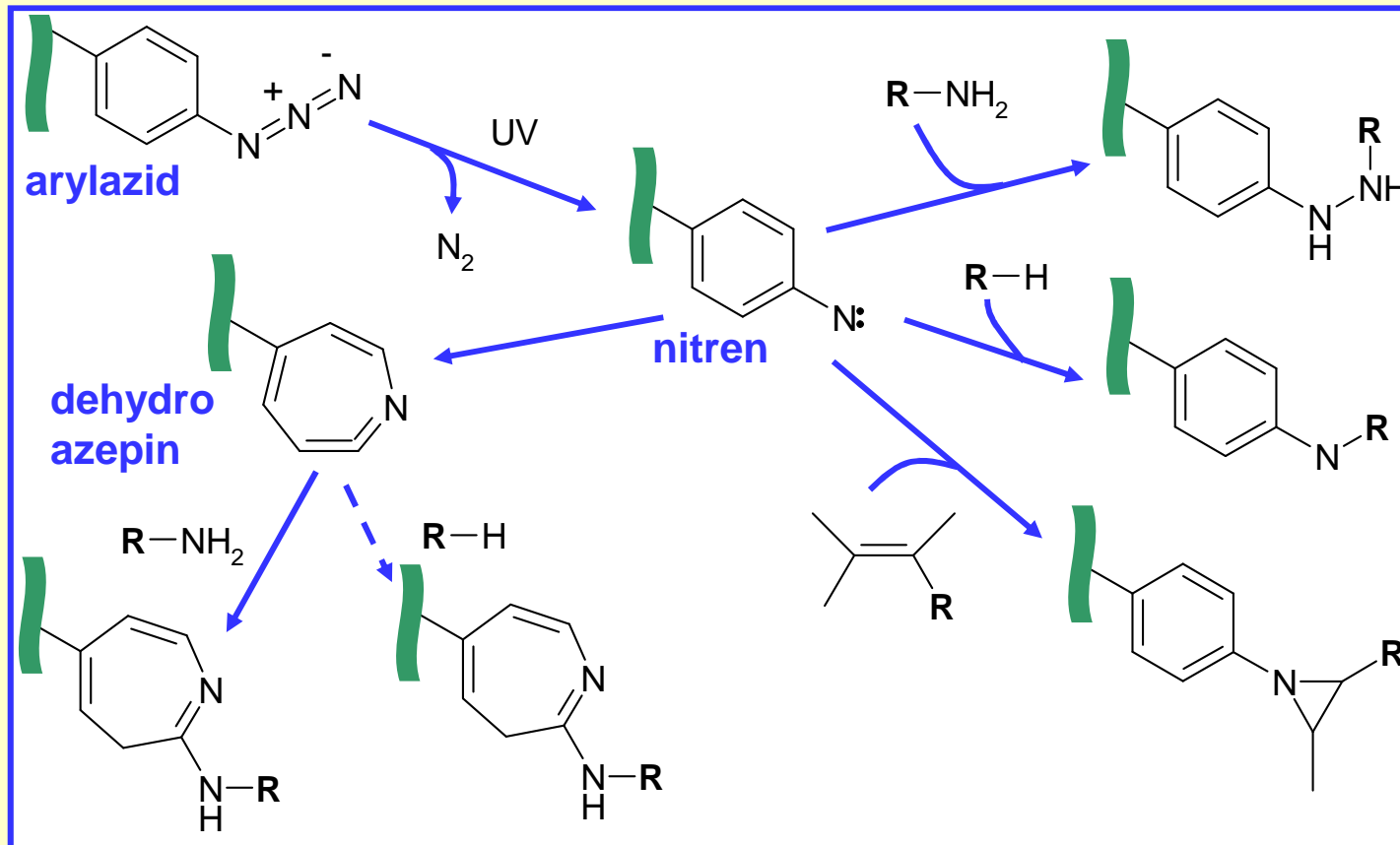
Spojení $>C=O$ a $-SH$

- pro konjugaci zejména sacharidů (a glykoproteinů)
 - oxoskupina se snadno generuje mírnou oxidací jodistanem
 - reaguje s ní zejména hydrazidová skupina
 - z druhé strany se účastní skupiny popsané již dříve
- hydrazid kyseliny 4-(4-N-maleimidofenyl)-másečné (**MPBH**), $z = 1,79$ nm
 - je vhodné provést reakci nejprve s SH skupinou, purifikovat produkt a následně připojit aldehydovou skupinu.
- rozebíratelné spojení se získá 3-(2-pyridyldithio)-propionylhydrazidem (**PDPH**)

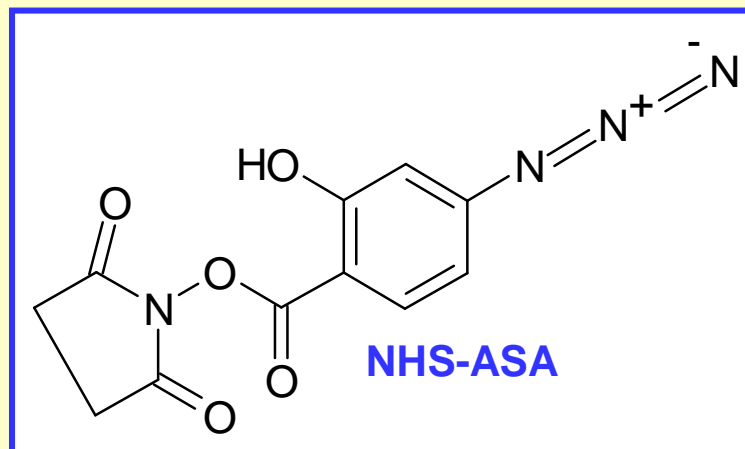


Amino- a fotoreaktivní konjugační činidla

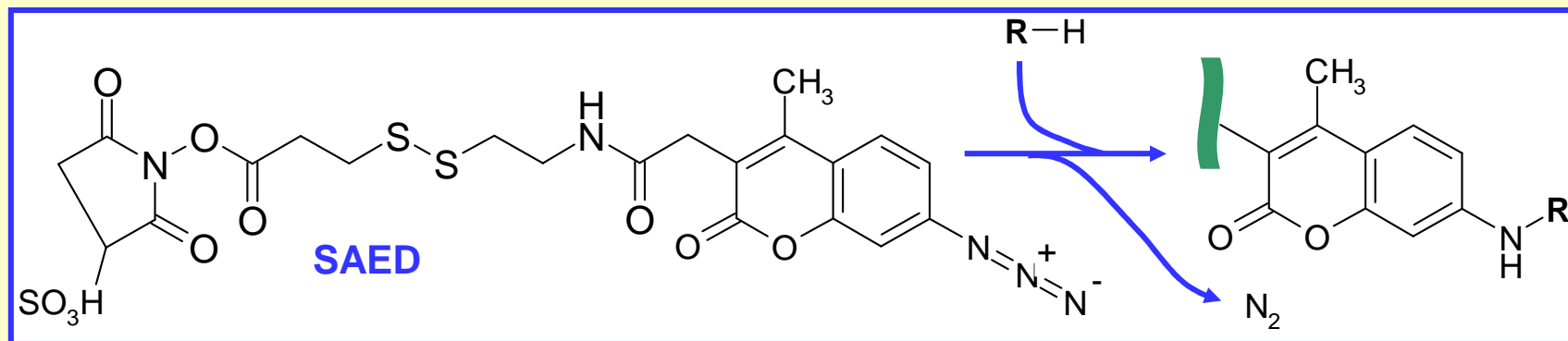
- jedna část činidel je aktivována světlem - **arylazidy**, fluorované aryl azidy, benzofenony, některé diazosloučeniny a diazirinové deriváty
 - první konjugační reakce napojí činidlo na biomolekulu (pracovat ve tmě)
 - odstraní se nadbytek činidla a navázaná fotoreaktivní skupina pak po osvětlení reaguje s partnerskou biomolekulou



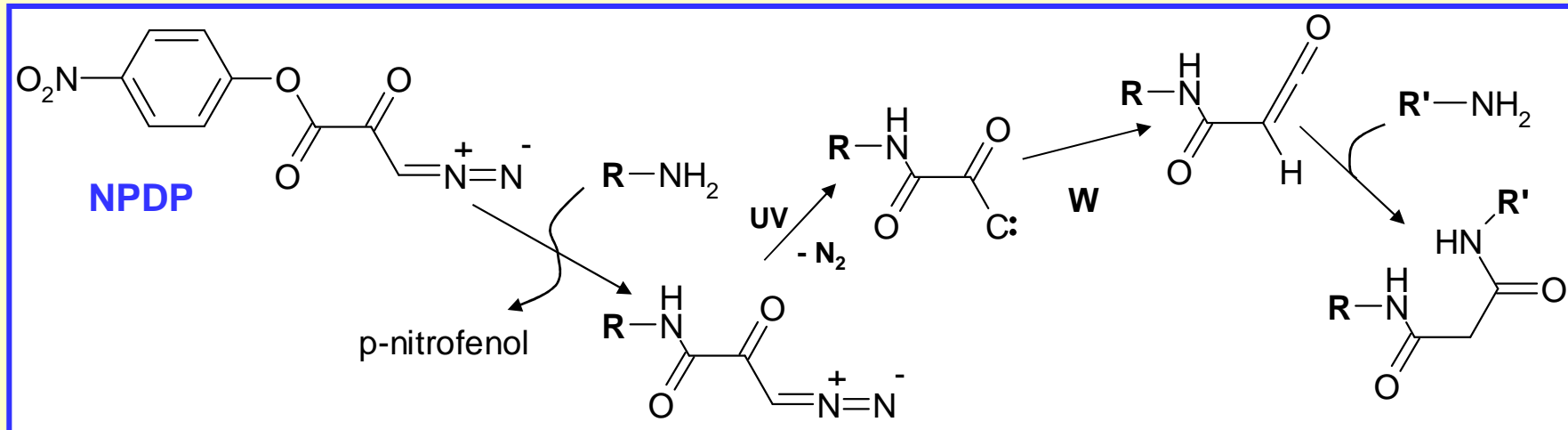
- **N-hydroxysukcinimidyl-4-azidosalicylát (NHS-ASA, 0,80 nm)**
 - derivatizuje aminoskupiny obvyklým způsobem – vznik amidové vazby
 - k dispozici jsou i varianty Sulfo-NHS-ASA a Sulfo-NHS-LC-ASA (1,8 nm)
- **fenolický hydroxyl aktivuje benzenové jádro pro značení radioaktivním jodem, to lze provést před fotoreakcí**
 - k dispozici jsou varianty bez hydroxylu na benzenovém jádře:
- **N-hydroxysukcinimidyl-4-azidobenzoát (HSAB, 0,90 nm)**
- **případně s nitroskupinou N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcinimid (ANB-NOS, 0,77 nm)**
- **štěpitelné konjugáty poskytuje sulfosukcinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionát (SASD, 1,89 nm)**
- **linker může být alifatický řetězec u N-sukcinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrofenylamino)hexanoátu (SANPAH, 1,82 nm)**
 - nitroskupina podporuje fotoaktivaci již nad 320 nm



- sulfosukcinimidyl-2-(7-azido-4-methylkumarin-3-acetamid)ethyl-1,3'-dithiopropionát (**SAED**, 2,25 nm)
 - vzniklý konjugát obsahuje fluoreskující uskupení – derivát kumarinu
 - lze tak pohodlně sledovat pohyb konjugátu
 - fluorescence se přitom iniciuje až po fotolytické reakci
- podobně se chová sulfosukcinimidyl-7-azido-4-methylkumarin-3-acetát (**Sulfo-SAMCA**, 1,28 nm)



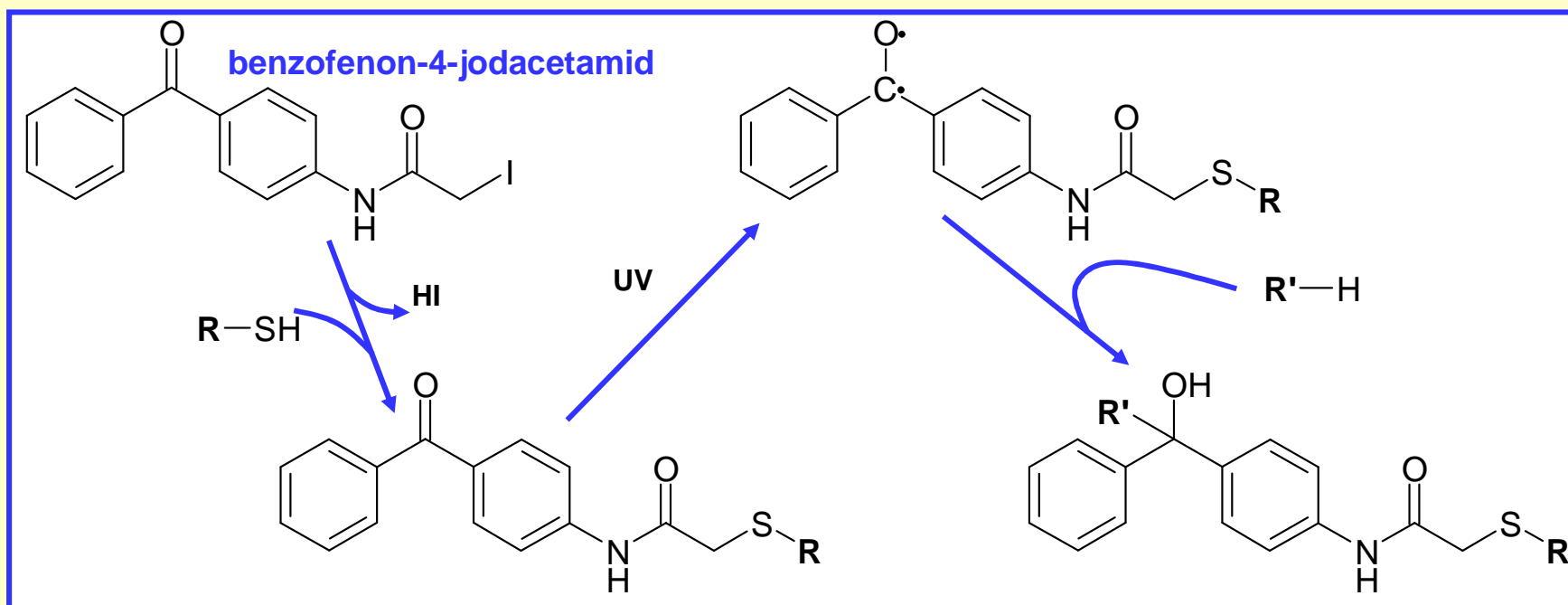
- alternativní fotolytickou skupinou je **diazopyruvátové** uskupení
 - poskytuje reaktivní karbenové uskupení, které se přemění Wolfovým přesmykem (W) na ketenové uspořádání
 - pak aduje nukleofilní skupinu - *p*-nitrofenyldiazopyruvát (pNPDP)



- podobným mechanismem reaguje i *p*-nitrofenyl-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionát (PNP-DPT)

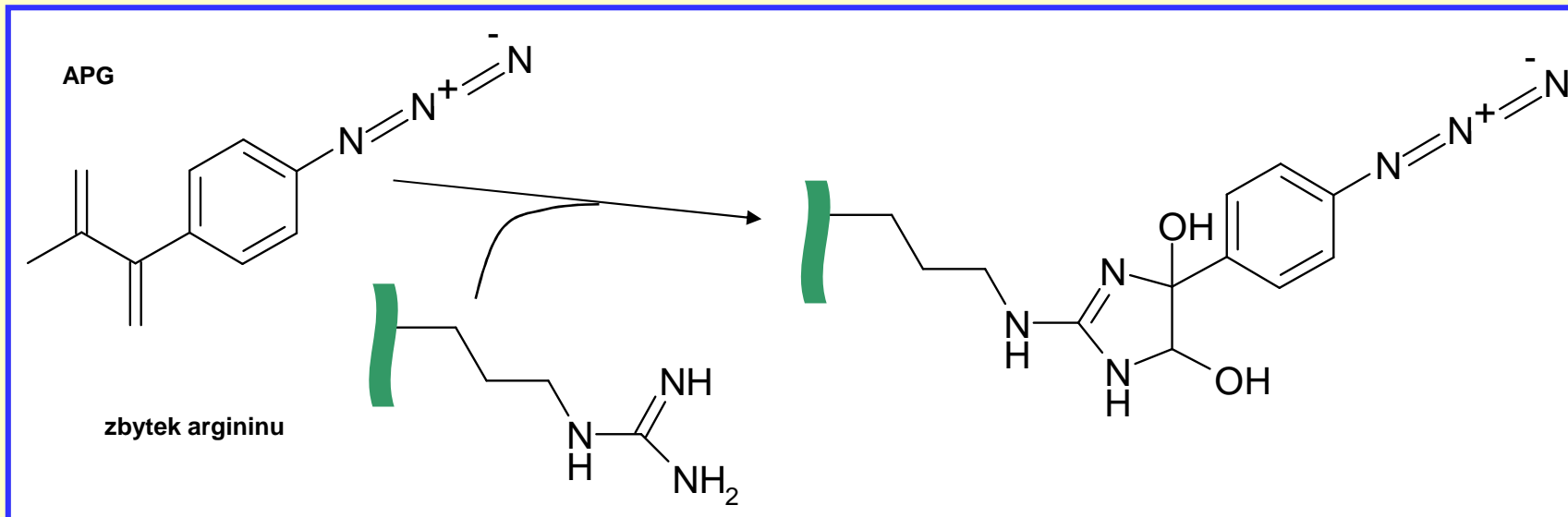
Sulfhydrylová a fotoreaktivní konjugační činidla

- kombinací předchozích skupin je 1-(*p*-azidosalicylamido)-4-(jodacetamido)butan (ASIB) a N-[4-(*p*-azidosalicylamido)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamid (APDP)
- jinou fotoaktivní část obsahuje **benzofenon-4-jodacetamid**
 - výhoda benzofenonu - možnost opakovaného průběhu fotoaktivace i po nekonjugační zpětné rekombinaci volných elektronů
 - vyšší výtěžky konjugace
 - alternativní SH-reaktivní část má benzofenon-4-maleimid



Další fotokonjugace

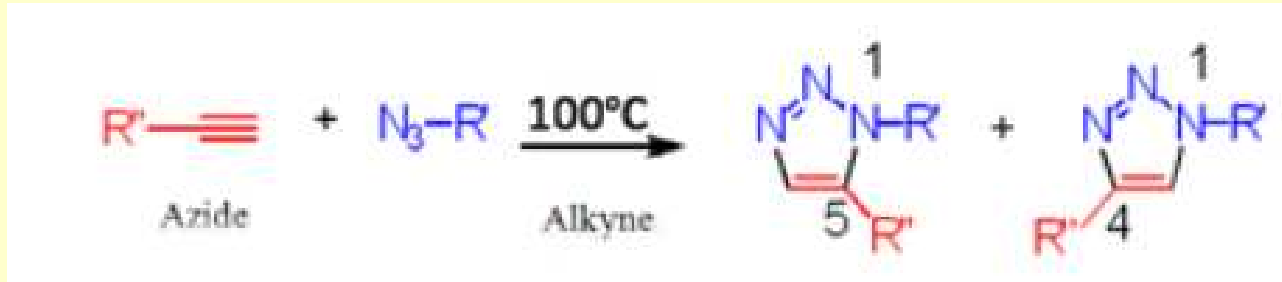
- s guanidinovou skupinou argininu může reagovat *p*-azidofenyglyoxal (APG)



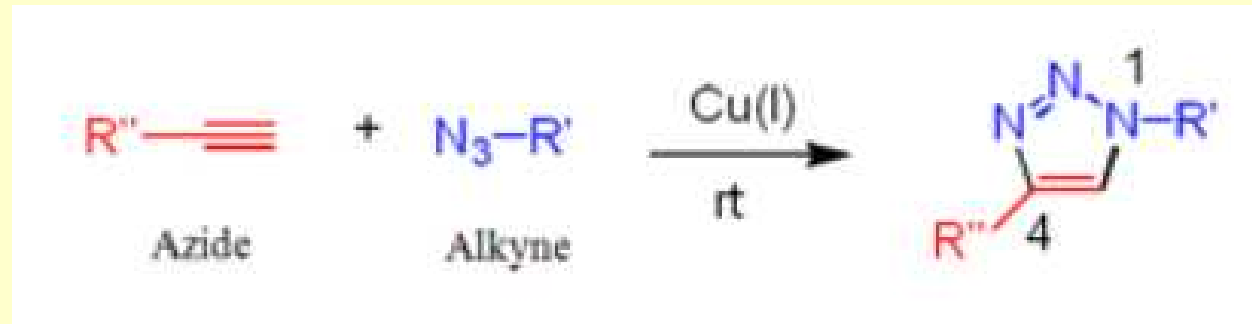
- pro napojení fotoaktivní části na aldehydovou skupinu je použitelný *p*-azidobenzoylhydrazid (ABH)
- karboxyskupina může být fotoaktivována pomocí 4-(*p*-azidosalicylamido) butylaminu (ASBA)
 - jeho volná aminoskupina se spojí s karboxylem v přítomnosti karbodiimidu, kdy vznikne amidová vazba

Click-konjugace – modulární syntéza

- základem Huisgenova cykloadice:

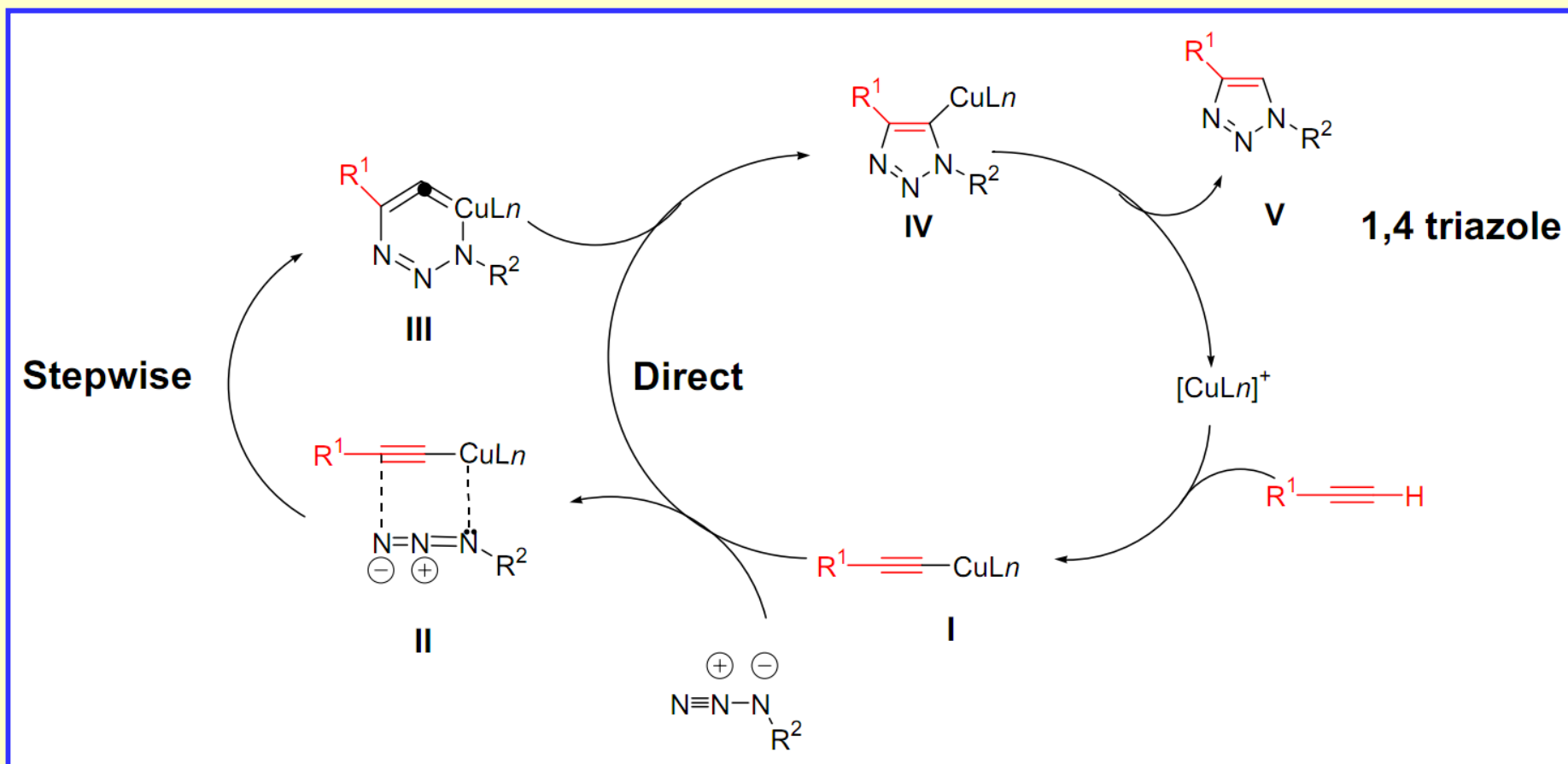


- za několik hodin vznikne směs 1,4- a 1,5-triazolů
- Fokin a Sharpless – v přítomnosti Cu(I) se reakce zrychlí na minuty a probíhá za normální teploty:

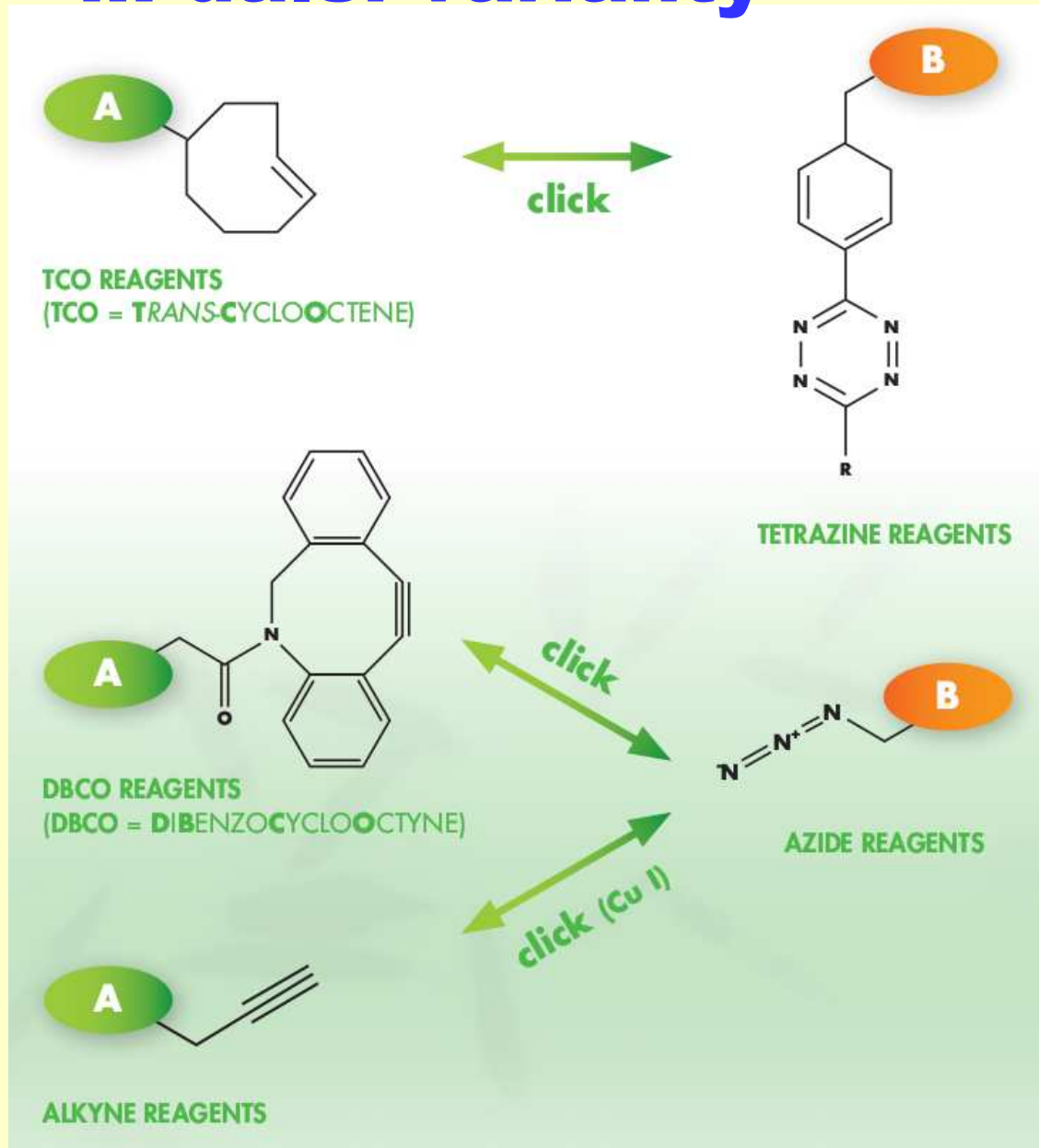


- přitom vzniká převážně 1,4-isomer
 - pokud by byl žádoucí 1,5-isomer, použije se katalýza Ru

Mechanism



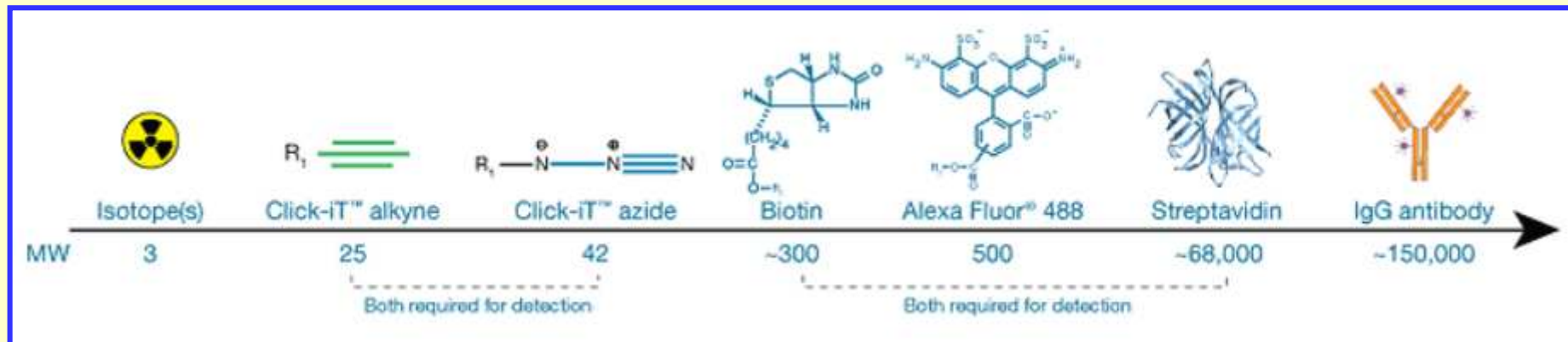
... další varianty



- www.click-chemistry.net
(Jena Bioscience)
- jsou i varianty, které nepotřebují Cu(I) – využití v biologických systémech

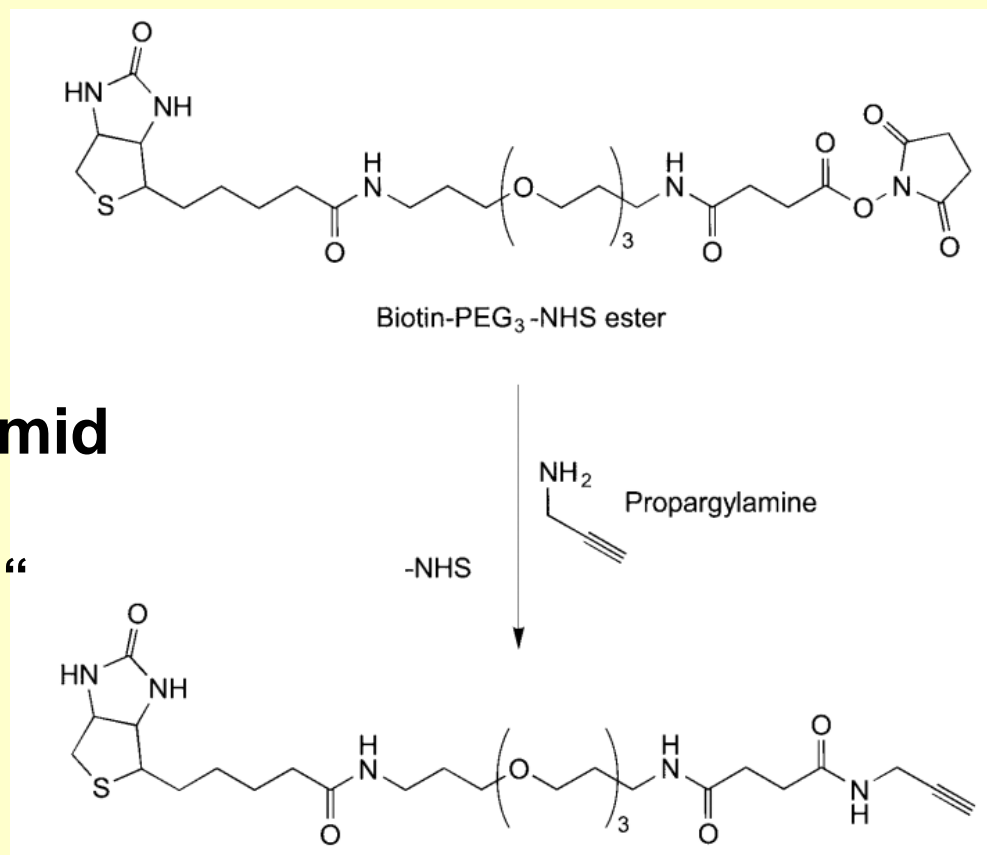
Výhody oproti klasickému postupu

- reagensie cílené na $-NH_2$ a $-SH$ skupiny
 - značení a konjugace čistých proteinů (biopolymerů), které se následně přidají do biologického systému
 - pokud se reagensie přidají do komplexního biosystému (např. buňky), tak se označí (konjuguje ...) nespecificky mnoho biopolymerů
- Click-iT značení
 - reagující partneři vznikají z nově syntetizovaných biopolymerů díky přidaným prekurzorům
 - v přirozeném biosystému se nevyskytují
 - výhodou je i malá velikost značky:

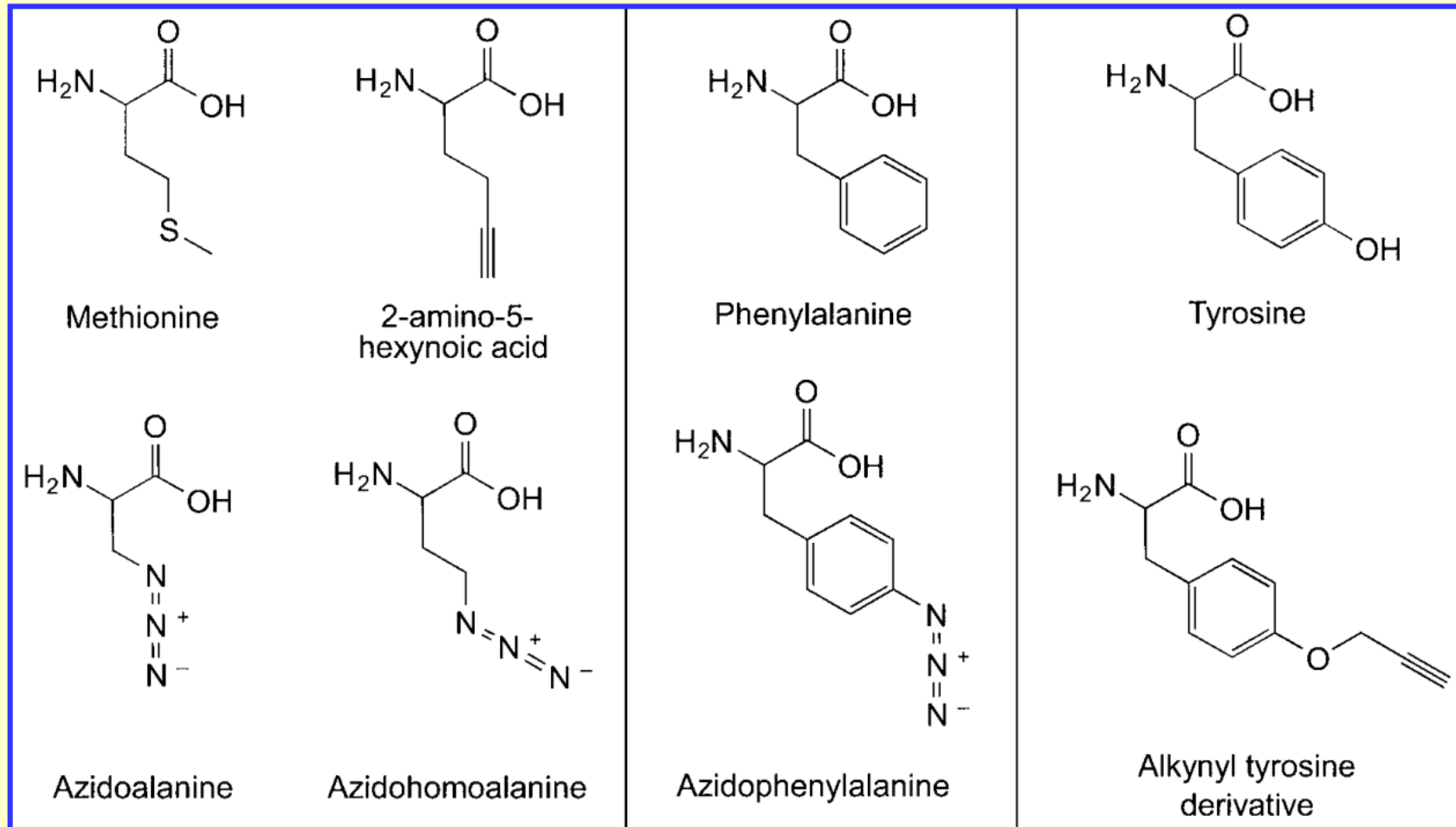


Příprava click-reagencií

- **biotin-PEG3-propargylamid**
 - zavedení alkynové konc. skupiny do „bioafinitních“ značek
 - Cu(I) je vhodnější dodat jako Cu(II) a zredukovat přímo v reakční směsi

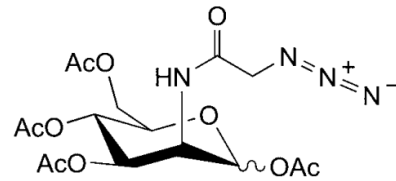


Záměna aminokyselin

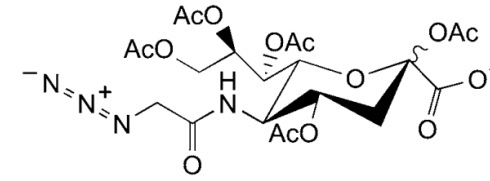


- vestaví se do nativních bílkovin při proteosyntéze místo přirozené aa

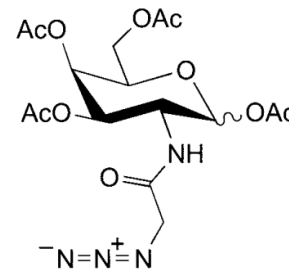
Záměna sacharidových jednotek



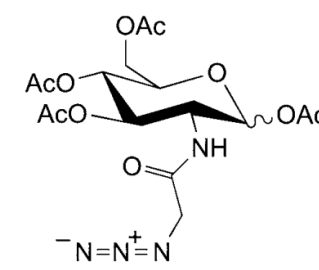
Azido-N-acetyl
mannosamine
derivative (ManNAz)



Azido-N-acetyl
sialic acid derivative
(SiaNAz)



Azido-N-acetyl
galactose derivative
(GalNAz)



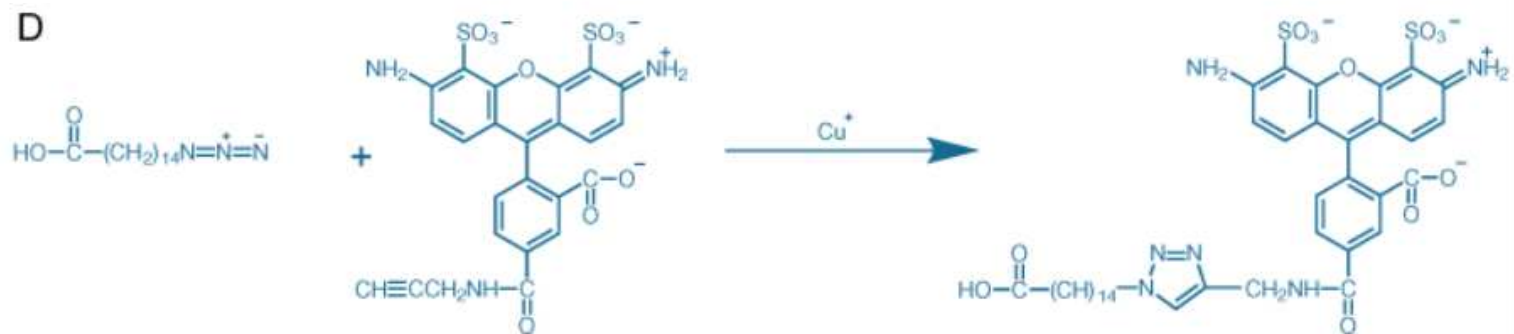
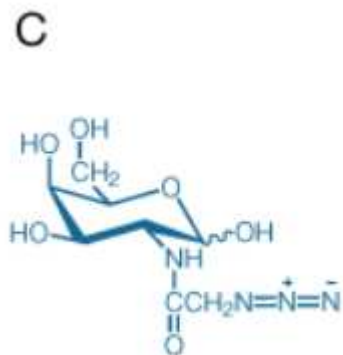
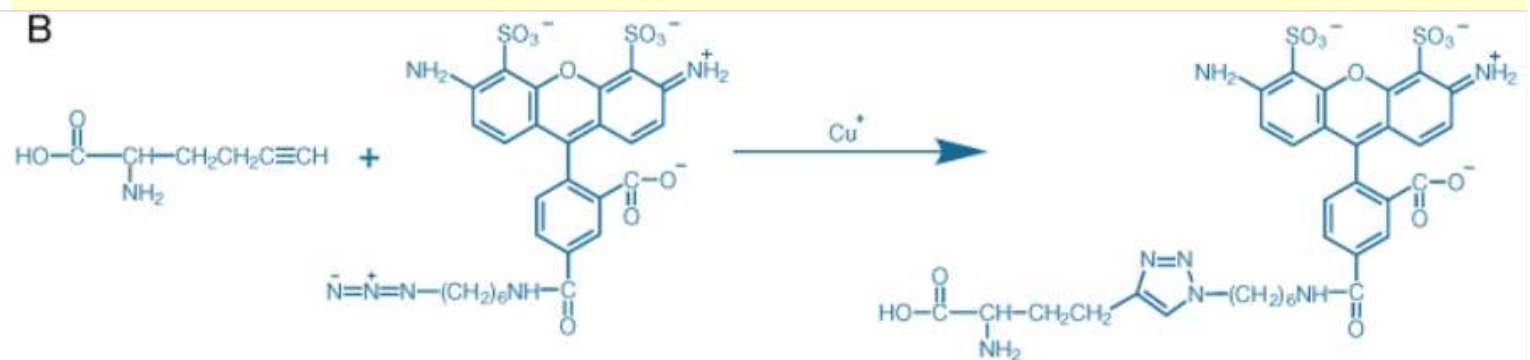
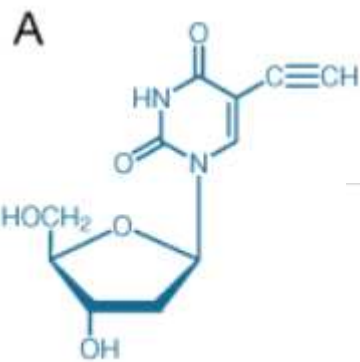
Azido-N-acetyl
glucose derivative
(GlcNAz)

- **vestavba azidové skupiny do oligo/polysacharidů a do glykoproteinů**
 - **acetylace umožní průchod do buněk**

Další click prekurzory

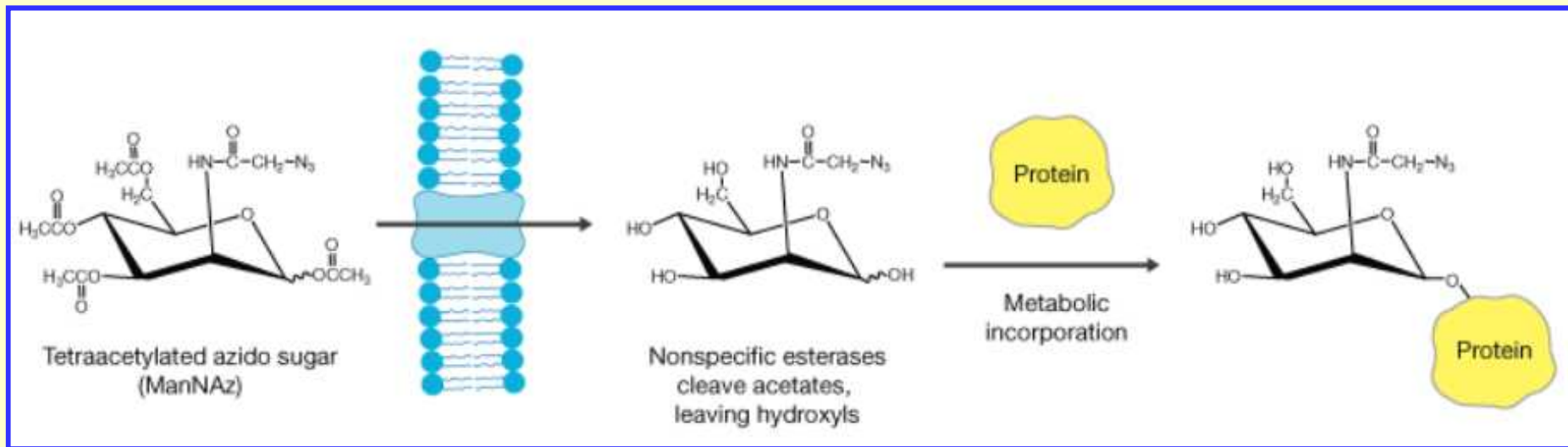
- k dispozici pro různé biosyntetické reakce:

» A nukleové kyseliny, B proteiny, C sacharidy, D lipidy



Průchod do buňky

- pro post-translační modifikaci proteinů:



- přidá se upravený (acetylovaný) prekurzor, který projde buněčnou membránou
- uvnitř se deacetyluje a zapojí se do biosyntetických reakcí
- vzniklé produkty lze následně afinitně značit, separovat, ...
- www.lifetechnologies.com