



**TURUN
YLIOPISTO**

Staudingerin ligaatio ja sen sovellutukset biokonjugointimenetelmänä

LuK-tutkielma
Bio-organisen kemian tutkimusryhmä
Turun yliopisto

Laatija:
Eevi Kallio

6.5.2024
Turku

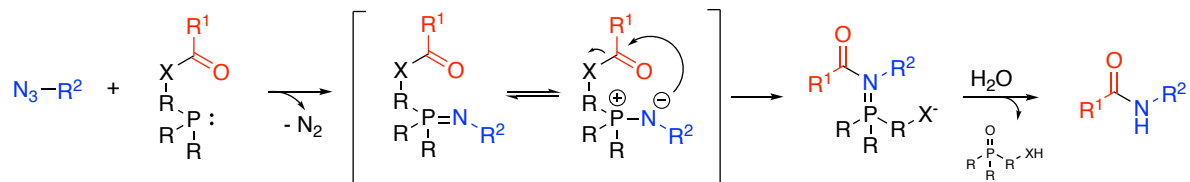
Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Oppiaine: Kemia**Tekijä:** Eevi Kallio**Otsikko:** Staudingerin ligaatio ja sen sovellutukset biokonjugointimenetelmänä**Ohjaaja:** Prof. Pasi Virta**Sivumäärä:** 18 sivua**Päivämäärä:** 6.5.2024

Staudingerin reaktio on atsidin ja fosfiinin välinen kaksivaiheinen reaktio. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa muodostuu välituotteena iminofosforaani, joka tämän jälkeen hydrolysoituu fosfiinioksidiksi ja amiiniksi. Kun reaktiota hyödynnetään kahden molekyylin välisessä ligaatiossa, iminofosforaanivälivaihe johtaa tehostettuun amidisidoksen muodostumiseen (Kaavio 1). Reaktiota alettiin tutkimaan jo vuonna 1919, mutta vasta 1990-luvulla todettiin sen potentiaalisuus biokonjugointimenetelmänä.

Staudingerin ligaatiosta on kehittynyt 2000-luvulla yksi tärkeimmistä ja tehokkaimmista biokonjugointimenetelmistä sen keskeisten ominaisuuksien ansiosta, joita ovat muun muassa biologinen yhteensopivuus, kemoselektiivisyys, sekä reaktion nopeus. Sen on todettu yhdistävän biologisesti tärkeitä komponentteja erittäin tehokkaasti. Staudingerin ligaatio voidaan luokitella bio-ortogonaalisiin click-reaktioihin, jotka tapahtuvat nopeasti ja palautumattomasti ilman sivureaktioita. Tämä johtaa reaktion suureen saantoon pienissäkin pitoisuuksissa.

Staudingerin ligaatiota käytetään monissa konjugointireaktioiden sovellutuksissa. Selektiivisyytensä takia reaktiota voidaan hyödyntää monimutkaisissakin biologisissa ympäristöissä ja jopa elävässä solussa. Staudingerin ligaatiota on käytetty lähivuosina kemiallisessa biologiassa erityisesti peptidi- ja proteiinisynteessissä, post-translationalisissa modifikaatioissa, sekä DNA:n leimauksessa. Näiden lisäksi ligaatiota voidaan hyödyntää esimerkiksi lääkeainekuljetusjärjestelmissä sekä mikrosirujen kehityksessä.



Kaavio 1. Staudingerin ligaation perusperiaate.

Avainsanat: Biokonjugatio, Staudingerin ligaatio, kemoselektiivisyys, bio-ortogonaaliset reaktiot

Sisällysluettelo

1	Johdanto	4
2	Lähtöaineet	5
2.1	Atsidit	5
2.2	Fosfiinit	5
3	Reaktiomekanismit	6
3.1	Ei-jäljetön Staudingerin ligaatio	7
3.2	Jäljetön Staudingerin ligaatio	7
3.3	Staudingerin fosfiittireaktio	8
4	Staudingerin ligaation ominaisuuksia	10
5	Staudingerin ligaation sovellutukset	11
5.1	Staudingerin ligaatio biokonjugointimenetelmänä	11
5.2	Staudingerin ligaatio biomolekyylien leimausmenetelmänä	12
5.2.1	Ei-luonnolliset nukleiinihapot	12
5.2.2	DNA:n biotiinileimaus	13
5.3	Mikrosirujen valmistus Staudingerin ligaation avulla	14
5.4	Staudingerin ligaatio lääkekehityksessä	14
5.4.1	Liposomit lääkeainekuljetuksessa	14
5.4.2	Staudingerin ligaatio aihiolääkkeissä	15
6	Yhteenveto	17
	Viitteet	18

1 Johdanto

Kemiallisessa biologiassa on lähivuosina pyritty kehittämään uusia ja tehokkaita biokonjugointimenetelmiä. Biokonjugatio eli biomolekyylien liittäminen toisiinsa kovalenttisesti, on oleellinen osa monia biokemiallisia sovellutuksia. On olemassa paljon erilaisia biokonjugointimenetelmiä, mutta niiden ongelmana on ollut yleisesti heikko kemoselektiivisyys. Biokonjugointimenetelmät vaativat kemoselektiivisiä ja bio-ortogonaalisia reaktioita, joilla pystytään tutkimaan biologisia mekanismeja ja luomaan uusia biolääkkeitä. Haasteena on löytää mekanismeja, jotka konjugoivat biomolekyyliä tehokkaasti ilman, että ympäristön yhdisteet ja olosuhteet haittaavat reaktion tehokkuutta.

Vuonna 1919 saksalainen kemisti, Hermann Staudinger, raportoi, että reaktio atsidin ja fosfiinin välillä tuottaa välituotteena iminofosforaanin. Iminofosforaani hydrolysoituu fosfiinioksidiksi ja primääriseksi amiiniksi. Reaktio tapahtuu miedoissa olosuhteissa vesiliuoksessa ja sivutuotteita muodostuu minimaalisesti. Reaktiota käytettiin alun perin orgaanisissa synteeseissä ja todettiin sen teho ja potentiaali.

Vasta 2000-luvun alussa Staudingerin reaktiota pystyttiin hyödyntämään biomolekyylien konjugoinnissa. Näin syntynyt Staudinger ligaatio, eli biomolekyylien liittäminen fosfodiesterisidoksella toisiinsa, on yksi tärkeimmistä ja tehokkaimmista biokonjugatiomenetelmistä, koska sillä on bio-ortogonaaliselle kemialle keskeisiä ominaisuuksia. Näihin ominaisuuksiin lukeutuvat esimerkiksi biologinen yhteensopivuus ja kemoselektiivisyys, eli kyky reagoida yhdisteen tietyn funktionaalisen ryhmän kanssa saman yhdisteen jonkin toisen funktionaalisen ryhmän sijasta. Näitä ominaisuuksia tarvitaan monissa sovellutuksissa ja ne mahdollistavat reaktion käytön jopa elävässä solussa. [1] Staudingerin ligaatiota on käytetty lähivuosina erityisesti kemiallisessa biologiassa peptidi- ja proteiinisynteesissä, lääkeainekuljetuksessa, post-translationalisissa modifikaatioissa, sekä DNA:n leimauksessa [2]. Tutkielmassa käydään läpi Staudingerin ligaation mekanismit ja sen sovellutuksia.

2 Lähtöaineet

2.1 Atsidit

Atsidit ovat suuri joukko yhdisteitä, jotka sisältävät anionina atside-ionin, eli N_3 -ryhmän. Staudingerin ligaatiossa käytetään yleisimmin alifaattisia ja aromaattisia atsideja. Atsidit ovat inertejä ja stabiileita yhdisteitä, jotka toimivat reaktiossa elektrofiilinä. [2], [1] Atsidit toimivat reaktiossa elektronien vastaanottajina eli elektrofiileinä. Elektroniköyhät atsidit ovat reaktiivisimpia. [3]

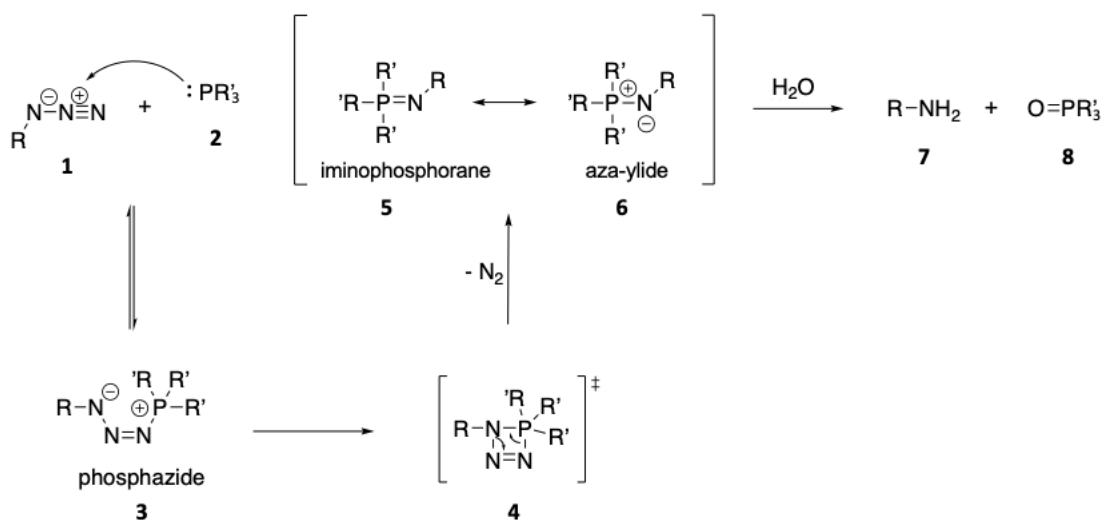
2.2 Fosfiinit

Fosfiinit ovat tyydyttyneitä fosforihydrideitä muotoa P_nH_{n+2} . Tarkemmin fosfiinit ovat kolmiarvoisia fosforiyhdisteitä. Staudingerin reaktiossa lähtöaineena on tarkemmin trialkyylifosfiini, joka toimii reaktiossa nukleofiilinä. Staudingerin reaktiossa pystytään hyödyntämään yleisesti sekä aromaattisia että alifaattisia fosfiineja. Elektronirikkaat fosfiinit ovat reaktiivisempia, joten ne toimivat reaktiossa tehokkaammin etenkin elektroniköyhien atsidien kanssa. Fosfiinin fluoresoivien varianttien on todettu omaavan parempi erotuskyky sivutuotteista. Fluoresoivat variantit edistävät myös sivutuotteiden erottelua. [2], [1]

3 Reaktiomekanismit

Atsidi toimii reaktion ensimmäisessä vaiheessa elektrofiilinä ja fosfiini nukleofiilina. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu kolmiarvoisen fosforiatomin **2** nukleofiilinen hyökkäys atsidin **1** terminaaliseen typpi-atomiin. Ensimmäisessä vaiheessa muodostuu välituotteena fosfatsidi **3**. Reaktion toisessa vaiheessa muodostuu neliatomisen renkaan siirtymätila, jolloin fosfatsidi stabilisoituu. Kun typpi-atomi lohkeaa pois, muodostuu iminofosforaani **5**. Iminofosforaani on aina tasapainossa sen atsyyliidimuodon **6** kanssa. [3]

Reaktio voi olla joko ensimmäisen tai toisen kertaluvun reaktio riippuen siitä, onko nopeutta rajoittava vaihe fosfatsidin muodostuminen vai intramolekulaarinen hajoaminen. Staudingerin reaktion viimeisessä vaiheessa iminofosforaanista muodostuu hydrolyysissä primääriäinen amiini **7** ja fosfiinioksidi **8**, niin sanotussa Staudingerin vähennysreaktiossa (Staudinger reduction). [3] Iminofosforaanissa on kuitenkin vahvasti nukleofiilinen typpi-atomi, jolloin välituote voi reagoida lähes minkä tahansa elektrofiilisen reagentin kanssa muodostaen merkittäviä välituotteita. [2]



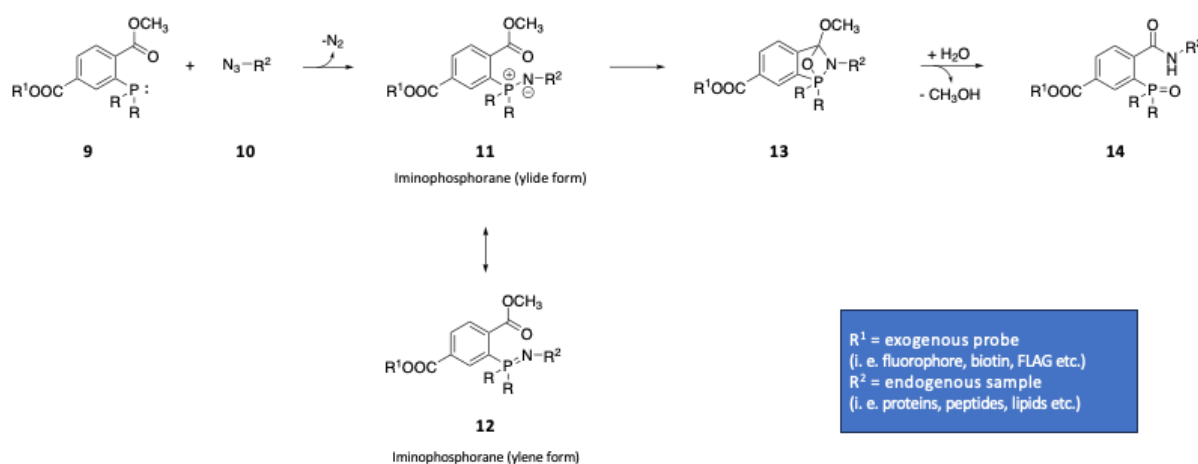
Kaava 1. Staudingerin reaktio atsidin ja fosfaanin välillä. Muotoiltu lähteestä [4].

Kun Staudingerin reaktiota hyödynnetään kahden molekyylin välisessä ligaatiossa, iminofosforaanivälivaihe johtaa tehostettuun amidisidoksen muodostumiseen. Staudingerin ligaatiota on kolme eri varianttia, jäljetön (traceless), ei-jäljetön (non-traceless), sekä Staudingerin fosfiittireaktio. Seuraavaksi käydään läpi kolme ligaation varianttia ja niiden mekanismit.

3.1 Ei-jäljetön Staudingerin ligaatio

Ei-jäljetön (nontraceless) Staudingerin ligaatio, toisin sanoen ei-jäljetön atsidi-fosfiiniligaatio, on ensimmäinen ligaation variantti. Reaktio esitettiin ensimmäisen kerran vuonna 2000. Toisena lähtöaineena toimivassa fosfiinissa on niin sanottu elektrofiilinen ansa, useimmiten esteri, jonka tarkoituksena on tuottaa yksi amidisidoksella yhteen liitetty tuote. Reaktiossa muodostuu amidi, johon on sisällytetty fosfiinioksidi. Ligaatiossa muodostuu karboksiamidi, jonka yhtenä funktionaalisenä ryhmänä on muodostunut fosfiinioksidi. [2]

Esimerkkireaktiossa (kaava 2) on lähtöaineina ortofosfaanitereftaalihappojohdannainen **9** ja atsidi **10**. [2] Nukleofiilina toimivan fosfiinin fosforiatomi hyökkää atsidin elektrofiiliseen typpiin samalla tavalla kuin Staudingerin vähennyksessä, jolloin lohkeaa typpi, ja välituotteena muodostuu iminofosforaani **12**. Iminofosforaani on jälleen tasapainossa sen atsylidimuodon **11** kanssa. Fosfiiniin lisätty elektrofiilinen esteriosa kaappaa läheisen iminofosforaanin nukleofiilisen typpiin, jolloin muodostuu syklinen oksatsafosfetaani **13**. Tämän välituotteen hydrolysoituessa muodostuu amidi **14**, johon on sisällytetty fosfiinioksidiosa. Säilyvän fosfiinioksidiosan takia tätä ensimmäistä Staudingerin ligaation varianttia alettiin nimittämään ei-jäljettömäksi Staudingerin ligaatioksi (non-traceless). [3]



Kaava 2. Ei-jäljetön Staudingerin ligaatio. Muotoiltu lähteestä [2]

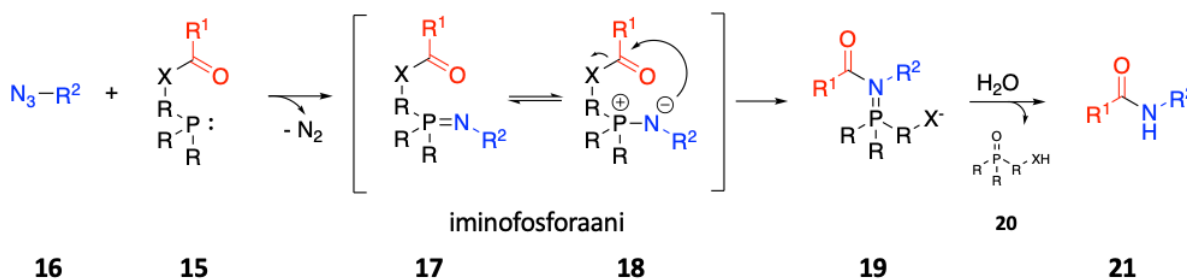
3.2 Jäljetön Staudingerin ligaatio

Staudingerin ligaation toinen variantti perustuu tutkija Vilarassan 1980-luvulla tehtyyn tutkimukseen, missä syntetisoitiin amideja karboksyylihapoista, atsideista ja fosfaaneista. [2]

Ei-jäljettömän Staudingerin ligaation ongelmana on tuotteeseen sisältyvä fosfaaniosa. Jäljetön (engl. traceless) Staudingerin ligaatio kehitettiin poistamaan tämä ongelma. Tarkoituksena oli kehittää konjugointimenetelmä, joka toimii vielä paremmin biologisissa ympäristöissä. Tämä variantti eroaa ei-jäljettömästä variantista siten, että fosforia sisältävä osan eliminoidaan amidisidoksen muodostuessa. Ligaatiossa kytkentäparin välille muodostetaan siis amidisidos siten, että saadaan tuote ilman triaryylifosfiinioksidiosaa. [2] Jäljettömän ja ei-jäljettömän variantin reaktiotuotteen eron määrää lähtöaineena toimivan fosfiinin asetylaatiomenetelmä [4].

Esimerkissä (kaava 3) jäljettömän Staudingerin ligaation lähtöaineena toimii asetyloitu fosfiini **15**, joka useimmissa tapauksissa on tioesteri. Asetyloitu fosfiini hyökkää nukleofiilisesti atsiidiin **16**, jolloin muodostuu välituotteena iminofosforaani **17**. Kuten ei-jäljettömässä variantissa, myös tässä iminofosforaani esiintyy sekä yleeni- että ylidimuodoissa. Iminofosforaani **18** karbonyyliryhmä reagoi atsidiosan kanssa muodostaen yhdisteen, jossa on sekä amidisidos, että fosfaaniosa. Muodostunut reaktiotuote **19** hydrolysoituu, jolloin fosfaanioksidiosa **20** eliminoituu ja jäljelle jää vain amidi **21**. [2]

Kemoselektiivisyyden ansiosta reaktio ei vaadi toksisia reagentteja. Reaktiota pidetään toimivimpana reaktiona elävässä solussa, sillä reaktiossa muodostuu oleellisimpana reaktiotuotteena luonnostaan eliöissä muodostuvia peptidisidoksia. [2]

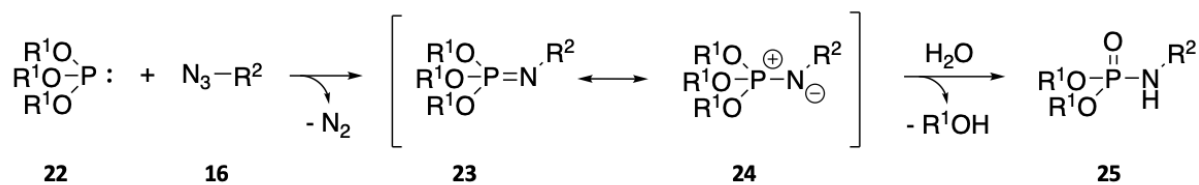


Kaava 3. Jäljetön Staudingerin ligaatio. Muotoiltu lähteestä [2].

3.3 Staudingerin fosfiittireaktio

Staudingerin fosfiittireaktiossa kolmiarvoisen fosfaanin korvaa lähtöaineena fosfiitti **22**. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa fosfiitti reagoi atsidin **16** kanssa, jolloin lohkeaa tyyppi, kuten reaktion aiemmissakin varianteissa. Välituotteena muodostuu trialkyylifosforimidiitti **23** ja sen ylidimuoto **24**. Välituotteen hydrolysoituessa muodostuu fosforamidiitti **25**. [2]

Tämän variantin etuja ovat symmetristen fosfiittien helppo saatavuus, miedot reaktioolosuhteet ja tuotteiden helppo puhdistus. Reaktiota on laajennettu epäsymmetristen fosfiittien käyttöön aryyliatsidien modifikaatioihin. Staudingerin fosfiittireaktiota käytetään laajasti proteiinien ja peptidien kemoselektiiviseen leimaukseen. [2]



Kaava 4. Staudingerin fosfiittireaktio. Mukailtu lähteestä [2].

4 Staudingerin ligaation ominaisuuksia

Staudingerin ligaatio on vahvasti kemoselektiivinen ligaatiomenetelmä. Kemoselektiivisyys kuvaa reagentin tai välituotteen kykyä reagoida yhden ryhmän tai atomin kanssa ennemmin kuin saman molekyylin toisen ryhmän tai atomin kanssa. Kemoselektiivisyys on erittäin tärkeä ominaisuus, sillä biologiset systeemit ovat rakenteellisesti monimutkaisia. Tarvitaan siis kaksi vastavuoroisesti reaktiivista funktionaalista ryhmää mitkä voidaan liittää kovalenttisesti toisiinsa. Funktionaalisten ryhmien tulee olla selektiivisiä toisilleen ja kestää moninaista joukkoa muita ryhmiä, jolloin reaktioon ei tarvita erikseen suojaryhmiä. [2] Ligaation on todettu yhdistävän biologisesti relevantteja komponentteja tehokkaasti. Staudingerin ligaation lopputuotteena on amidi, joka on luonnostaan biologisissa ympäristöissä esiintyvä yhdisteryhmä. [3]

Bio-ortogonaaliset click -reaktiot ovat reaktioita, jotka tapahtuvat nopeasti ja palautumattomasti biologisissa ympäristöissä ilman sivureaktioita endogeenisten funktionaalisten ryhmien kanssa. [3] Tämä johtaa yhden reaktiotuotteen suureen saantoon pienissäkin pitoisuuksissa. Click-reaktioilla on myös korkea reaktiospesifisyys [2]. Staudingerin ligaation luokitellaan bio-ortogonaalisiin click-reaktioihin. Nämä kaikki ominaisuudet mahdollistavat reaktion jopa elävässä solussa.

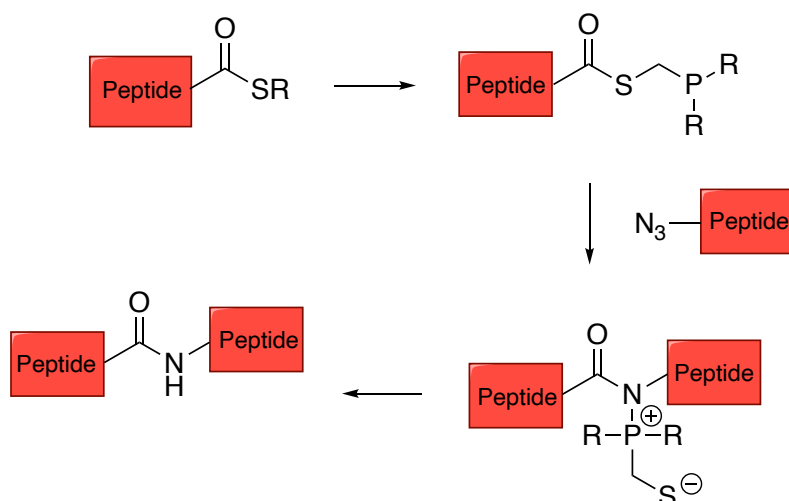
Reaktio tapahtuu vesiliuoksessa miedoissa olosuhteissa ja yleisin käytettävä reaktioliuotin onkin vesi. Myös joidenkin poolittomien liuottimien on todettu tuottavan suuria määriä haluttua reaktiotuotetta. Reaktio ei myöskään vaadi hankalia lämpötiloja, vaan se tapahtuu huoneenlämmössä. Vahvasti alifaattiset fosfiinit hapettuvat herkästi, joten biologisten systeemien ulkopuolella pitää ottaa huomioon hapen poistaminen. Biologisissa olosuhteissa tämä ei tietenkään ole mahdollista, jolloin fosfiinin hapettua voi tapahtua sivureaktioita. Sivureaktioita voi syntyä myös, jos iminofosforaani hydrolysoituu ennenaikaisesti, jolloin tuotteena on joko fosforyyliamiini tai amiini. [2]

5 Staudingerin ligaation sovellutukset

5.1 Staudingerin ligaatio biokonjugointimenetelmänä

Ligaation hyödyntäminen biokonjugointimenetelmänä vaatii biomolekyylin sisältävän joko atsidin tai fosfiinin. Yleisimmin käytössä näistä kahdesta on atsiidi sen koon ja stabiiliuden takia. Atsidiosa on myös helppo liittää biomolekyyliin, kuten glykaaneihin, proteiineihin, lipideihin ja DNA:han kemiallisin tai biosynteettisin menetelmin. [1] Esimerkissä käsitellään peptidien biokonjugaatiota.

Peptidit ovat aminohappoketjuja, jotka ovat yleensä 2–100 aminohappoa pitkiä. Peptidien konjugointiin tarvitaan kemoselektiivisiä ligaatiomenetelmiä, joissa lyhyemmät peptidifragmentit yhdistetään lopullisen synteettisen proteiinin muodostamiseksi. Kahden peptidifragmentin ligaatioon käytetään Staudingerin ligaation jäljetöntä (engl. traceless) variaatiota (kaava 5). Staudingerin ligaation on todettu olevan hyvä menetelmä peptidien konjugointiin, sillä yhdisteen sivuketjut eivät vaikuta reaktioon sen selektiivisyyden ansiosta. [5] Ligaatiossa peptidien välille muodostuu amidisidos, jolloin mahdollistetaan myös pidempien aminohappoketjujen synteesi. Ligaatiomenetelmä perustuu toisen peptidifragmentin C-päädyn tioesterin ja toisen peptidifragmentin N-päädyn kysteiniinjäännöksen väliseen reaktioon. [1]



Kaava 5. Peptidiligaatio ei-jäljettömällä Staudingerin ligaatiolla. Muokattu lähteestä [1].

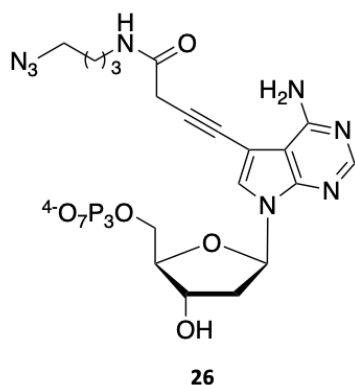
5.2 Staudingerin ligaatio biomolekyylien leimausmenetelmänä

Staudingerin ligaatiota käytetään paljon biomolekyylien leimauksessa. Biomolekyylien leimaus on yksi tärkeimmistä keinoista biologisten systeemien tutkimisessa. Yleisimpiä esimerkkejä menetelmistä ovat sokerien, proteiinien ja peptidien leimaus erilaisilla koettimilla. [2] In vivo -tutkimuksissa koettimen liittäminen sekä itse leimaus tapahtuvat jonkin elävän organismin sisällä.

Staudingerin ligaation hyödyntäminen leimausmenetelmänä vaatii biomolekyylin sisältävän joko atsidin tai fosfiinin. Yleisimmin biomolekyylien funktionalisointiin käytetään atsidia sen koon takia, ja koska fosfiinit hapettuvat helposti vesiliuoksessa. Atsidiosa on myös helpompi sisällyttää biomolekyyliin erilaisin menetelmin. Atsidi voidaan liittää proteiiniin kemiallisesti tai biokemiallisesti. Biokemiallisiin menetelmiin kuuluvat posttranslacionaaliset modifikaatiot ja atsidia sisältävien aminohappojen sisällyttäminen proteiineihin geenitekniikan menetelmin. [1]

5.2.1 Ei-luonnolliset nukleiinihapot

DNA:n selektiivinen leimaus vaatii sen funktionalisoinnin bio-ortogonaalisella funktionaalisella ryhmällä. Sekä asetyleeniä että atsidia sisältäviä tymidiinianalogeja on onnistuttu kehittämään ja hyödyntämään DNA:n leimauksessa. Atsidia sisältäviä nukleiinihappoja on syntetisoitu Staudingerin ligaation avulla käyttämällä modifioituja nukleiinihappojen rakennuspalikoita. Syntetisoituja nukleiinihappoja voidaan käyttää DNA:n muokkaamiseen. Tällä menetelmällä on syntetisoitu atsidio-2'-deoksiadenosiini-5'-*O*-trifosfaatti-, eli dATP-analogi **26**. *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) -lajin DNA-polymeraasi tunnisti analogin ja kaksi muuta atsidimodifioitua analogia kehitettiin samalla periaatteella. Atsidimodifioitujen rakennuspalikoiden sisällyttämisen jälkeen DNA-fragmentteihin käytettiin onnistuneesti Staudingerin ligaatiota. [1]

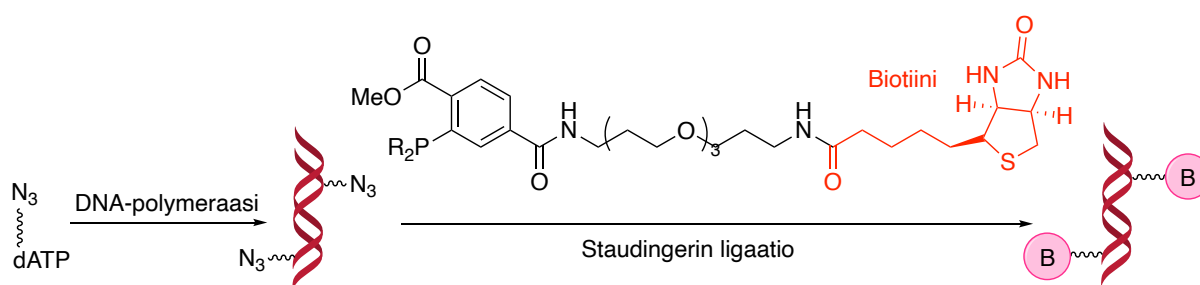


Kaava 6. dATP-analogi

5.2.2 DNA:n biotiinileimaus

Biotiinileimauksessa hyödynnetään biotiinin suurta sitoutumisaffiniteettia streptavidin-nimistä tetrameerista proteiinia kohtaan. Biotiinileimausta hyödynnetään esimerkiksi rasvahappomodifioitujen proteiinien detektoinnissa.

DNA-leimaus Staudinger ligaation avulla perustuu DNA-polymeraasin atsidimodifioituihin trifosfaatteihin, joita pystytään konjugoimaan ja sen avulla tuottamaan biotiini-leimattua DNA:ta. DNA:n leimausta biotiinilla on havainnollistettu kaavassa 7. [6] dATP-analogi **26** liitetään atsiidiin ja DNA-polymeraasi tunnistaa reaktiotuotteen. Tämän jälkeen hyödynnetään Staudingerin ligaatiota, jolloin saadaan biotiini-leimattua DNA:ta. Menetelmää rajoittaa tuotteen hankaloitunut puhdistaminen streptavidiinin kytkeytymisen jälkeen. [2]



Kaava 7. Atsidimodifioidun deoksiadenosiinitrifosfaatin (dATP) DNA-leimaus biotiinilla (B). Muotoiltu lähteestä [2].

5.3 Mikrosirujen valmistus Staudingerin ligaation avulla

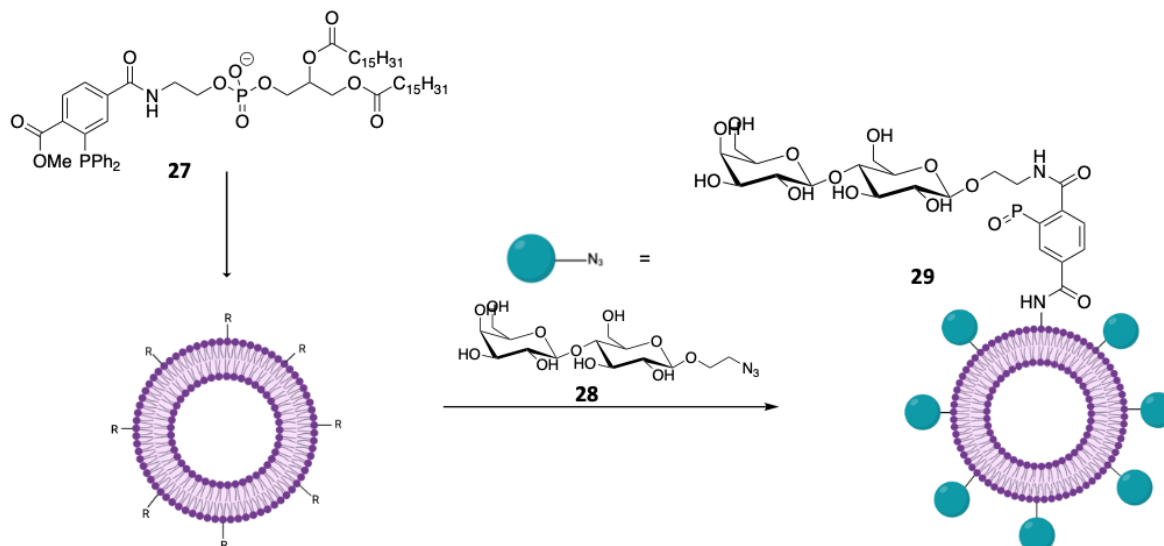
Staudingerin ligaatio on ollut suuressa roolissa biomolekyylien kovalenttisessa sitomisessa pinnoille sen kemoselektiivisyyden ansiosta. Tässä tutkielmassa käsitellään erityisesti peptidien ja pienten molekyylien immobilisaatiota lasipinnalla. Sovellutuksessa käytetään Staudingerin ligaation jäljetöntä varianttia. Ensin mikrosirun lasipinta muokataan reaktiolle sopivaksi fosfiinia sisältävällä linkkerillä. Halutut molekyylit valmistellaan kiinteän faasin yhdistävällä synteesillä, jonka jälkeen ne kytketään toisiinsa jäljettömän Staudingerin ligaation avulla. Kovalenttisesti sitoutuneet molekyylit altistetaan ligandia sitoville reaktioille mikrosirun pinnalla. S-peptidin atsidifunktionalisoitu N-pääty liitetään kovalenttisesti levyyn. Staudingerin ligaatiota hyödyntävä mikrosirun valmistusmenetelmä on hyvä mietojen reaktio-olosuhteiden takia. [2]

5.4 Staudingerin ligaatio lääkekehityksessä

5.4.1 Liposomit lääkeainekuljetuksessa

Staudingerin ligaatiota voidaan hyödyntää lipidien modifikaatioissa, jolloin voidaan laatia monenlaisia funktionaalisia liposomeja. Liposomit ovat lipidimolekyyleistä koostuvia rakkuloita, joita voidaan valmistaa esimerkiksi kolesterolista tai fosfolipideistä. Liposomin pinta koostuu kahdesta lipidimolekyylikerroksesta. Liposomit ovat tärkeä osa lääkeaineiden kuljetusta ja terapeuttisten lääkkeiden kapselointia, koska ne kulkeutuvat soluihin luonnostaan rakenteensa ansiosta. Kemoselektiivisten kytkentämenetelmien, kuten Staudingerin ligaation ansiosta niin sanottuja lipidiankkureita voidaan modifioida erilaisilla ligandeilla modulaarisesti. Linkitetyt ligandit voivat olla spesifisiä tietyille pintamolekyyleille, erityisesti reseptoreille solujärjestelmissä. Näin ollen reaktioita voidaan aiheuttaa tai inhiboida ja muodostetut funktionalisoidut liposomit toimivat lääkeaineiden kuljetuksessa.

Staudingerin ligaatio toimii sovellutuksessa erinomaisesti sen kemoselektiivisyyden takia. Myös yksinkertaiset reaktio-olosuhteet ja katalyytin, sekä suojaryhmien tarpeettomuus helpottaa reaktiota. Nämä piirteet mahdollistavat myös liposomien modifikaation pelkästään sen ulkopinnalla. Esimerkissä (kaava 8) esitetään liposomin pinnan glykofunktionalisaatio Staudingerin ligaation avulla.



Kaava 8. Liposomin pinnan glykofunktionalisaatio. Muotoiltu lähteestä [6]

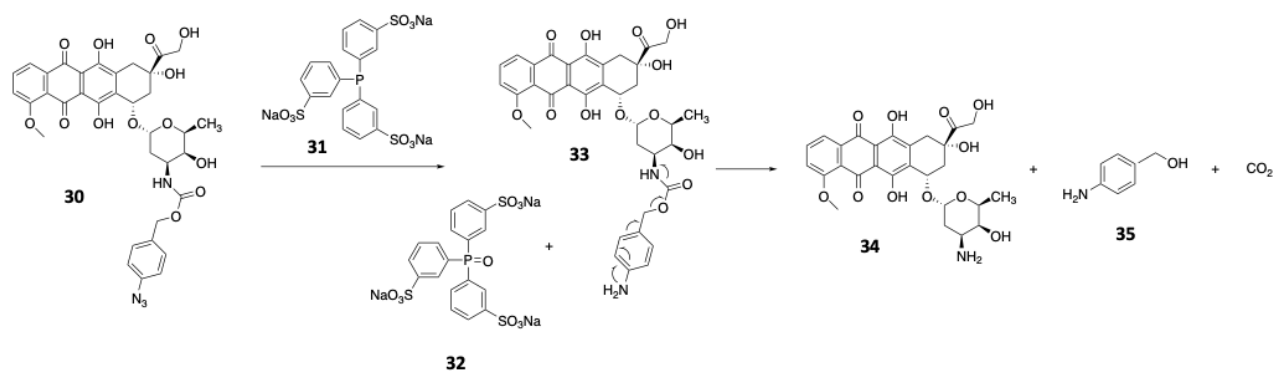
5.4.2 Staudingerin ligaatio aihiolääkkeissä

Staudingerin ligaatiota hyödynnetään myös biolääketieteessä aihiolääkkeen vapautumisen laukaisijana kohdesoluun. Aihiolääke on lääkeainemolekyylin inaktiivinen muoto, joka vasta elimistössä metaboloituu vaikuttavaksi lääkeaineeksi. Esimerkissä käsitellään erään syöpälääkkeen, doksorubisiinin, vapautumista syöpäkasvaimeen. [7]

Doksorubisiinin ongelma kemoterapeuttisena syöpälääkkeenä on sen heikko selektiivisyys. Yksi tapa aktivoida aihiolääke on paikallisen entsyymattisen toiminnan avulla. Tämä tarkoittaa sitä, että potilaalle annetaan ensin vasta-aine-entsyymi-konjugatti, joka sisältää syöväälle spesifistä vasta-ainetta ja aihiolääkkeen vapauttavan entsyymin. Tämä aiheuttaa kompleksin kertymisen syöpäsolujen lähetyville. Tällöin aihiolääke vapautuu entsyymin vaikutuksesta ajautuessaan syöpäsoluihin. Ongelmana tässä menetelmässä on kuitenkin mahdollinen entsyymin puute tai sen ajautuminen väärään sijaintiin. Lisäksi eksogeeniset entsyymit ovat usein immunogeenisiä, jolloin lääkkeen toistuva käyttö voi hankaloitua. [7]

Aihiolääke **30** sisältää syöpälääkkeen eli doksorubisiinin, jonka aminoryhmään on linkitetty *p*-atsidobentsyyli-laukaisin. Laukaisin lohkeaa pois aktivaattorin **31** kanssa reagoidessa. Lopputuotteena on siis aktivoitu doksorubisiini **34**. Laukaisin on *p*-aminobentsyylioksidikarbonyylijohtannainen, jota käytetään myös entsyymiaktivoiduissa aihiolääkkeissä. Aihiolääkkeen aktivointi Staudingerin ligaation avulla toimii teoriassa samalla tavalla kuin entsyymiaktivoidut aihiolääkkeet. Atsidin **30** pelkistäminen amiiniksi **33** aiheuttaa

tapahumaketjun, jossa yhdisteen **33** aminoryhmän pelkistyminen johtaa iminokinonimetidin eliminaatioon. Tällöin aktivoitu doksorubisiini **34** vapautuu. [7]



Kaava 9. Aihiolääkkeen **30** aktivointi Staudingerin ligaation avulla.

6 Yhteenveto

Staudingerin ligaatiota pidetään erittäin hyvänä biokonjugointimenetelmänä sen myrkyttömien reaktio-olosuhteiden ansiosta, mutta reaktiolla on kuitenkin joitakin rajoitteita, minkä takia muita vastaavia reaktioita hyödynnetään samoissa sovellutuksissa.

Staudingerin ligaation haittapuolena on esimerkiksi fosfiinien herkkyys hapettua niitä vastaaviksi fosfiinioksideiksi. Myös välituotteena toimivat iminofosforaanit ovat epästabiileja yhdisteitä, mikä hankaloittaa biologisia sovellutuksia. [3] Atsidiit sen sijaan ovat pysyviä yhdisteitä. Ne eivät reagoi muiden biologisissa systeemeissä esiintyvien funktionaalisten ryhmien, kuten amiinien tai muiden nukleofiilien kanssa. Atsideja pidetäänkin erityisen hyvänä ryhmänä biokonjugointireaktioissa. Atsideja hyödyntäviä biokonjugointimenetelmiä on myös muita, esimerkiksi yleisesti käytetyt atsidiin ja erilaisten alkyynien väliset [3 + 2]-sykloadditiot [2]. [3 + 2]-sykloadditio voi olla joko Cu(I) katalyyttinen tai alkyynikomponentin rengasjännityksen ajama. Cu(I)-katalyyttinen reaktio ei sovellu biologisiin systeemeihin sen toksisuuden vuoksi. [3 + 2]-sykloadditioreaktiossa alkyynejä muokataan triatsoleiksi, joka rajoittaa ko. ligaation käyttöä. Staudingerin ligaatio soveltuu erityisesti amidi-konjugoitujen kohderakenteiden valmistukseen. [2]

Staudingerin ligaatioon voidaan verrata biokonjugointimenetelmänä myös tioleja ja alkeeneja tai alkyynejä hyödyntäviä reaktiota. Näitä reaktioita ei ole tutkittu paljon in vivo, sillä tiolin ja alkeenin välisessä reaktiossa (thiol-ene reaction) muodostuu väliaineena vapaita radikaaleja (RS^{\cdot}). Muut solukomponentit estävät radikaalien reagoimista ja lopullisen biokonjugaation tapahtumista. Reaktiot ovat kuitenkin ortogonaalisia atsideille ja fosfiineille, jolloin niitä voitaisiin hyödyntää monimutkaisten konjugaattien valmistukseen. [2]

Viitteet

- [1] S. S. Van Berkel, M. B. Van Eldijk, and J. C. M. Van Hest, "Staudinger ligation as a method for bioconjugation," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no. 38. pp. 8806–8827, Sep. 12, 2011. doi: 10.1002/anie.201008102.
- [2] C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers, and S. Bräse, "The Staudinger Ligation," *Chemical Reviews*, vol. 120, no. 10. American Chemical Society, pp. 4301–4354, May 27, 2020. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00665.
- [3] E. Poulou and C. P. R. Hackenberger, "Staudinger Ligation and Reactions – From Bioorthogonal Labeling to Next-Generation Biopharmaceuticals," *Israel Journal of Chemistry*, vol. 63, no. 1–2. John Wiley and Sons Inc, Feb. 01, 2023. doi: 10.1002/ijch.202200057.
- [4] B. Sarkar and N. Jayaraman, "Glycoconjugations of Biomolecules by Chemical Methods," *Front Chem*, vol. 8, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.570185.
- [5] M. Köhn and R. Breinbauer, "The Staudinger ligation -: A gift to chemical biology'," *ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION*, vol. 43, no. 24, pp. 3106–3116, 2004, doi: 10.1002/anie.200401744.
- [6] C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, and S. Braese, "Bioconjugation via azide-Staudinger ligation: An overview," *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 9, pp. 4840–4871, 2011, doi: DOI: 10.1039/c0cs00123f.
- [7] R. Van Brakel, R. C. M. Vulders, R. J. Bokdam, H. Gröll, and M. S. Robillard, "A doxorubicin prodrug activated by the staudinger reaction," *Bioconjug Chem*, vol. 19, no. 3, pp. 714–718, 2008, doi: 10.1021/bc700394s.