

Klik-kemi - Kemi i Nobelklasse

Formål

Morten Meldal modtog i 2022 Nobelprisen i kemi for opdagelsen af den kobber(I)-katalyserede azid-alkyn cykloadditions-reaktion (CuAAC), som er en af de mest effektive reaktioner til klik-kemi. Formålet med øvelsen her er at belyse nogle af aspekterne ved klik-kemi.

Introduktion

Begrebet klik-kemi betegner høj-effektive kemiske reaktioner, der benyttes til at koble to (ofte store) molekyler sammen med høj selektivitet. Reaktionerne der benyttes til klik-kemi er ideelt set kendetegnet ved følgende egenskaber (som defineret oprindeligt af K. Barry Sharpless og medarbejdere. Sharpless modtog også nobelprisen i Kemi, sammen med Morten Meldal og Carolyn Bertozzi):

- Klik-reaktioner skal ...

- (1) være modulære - dvs. skal kunne benyttes sammen med andre klik-reaktioner, uafhængigt af hinanden
- (2) have få begrænsninger i (eller krav til) udformningen af reaktanterne
- (3) give meget høje udbytter, underforstået at de forløber meget hurtigt
- (4) kun generere ikke-reaktive biprodukter
- (5) være stereospecifikke
- (6) fungere under simple reaktionsbetingelser (ideelt være ikke-reaktive ift. oxygen og vand)
- (7) have let-tilgængelige udgangsstoffer og reagenser
- (8) forløbe uden brug af opløsningsmiddel eller med simple opløsningsmidler, f.eks. vand
- (9) give mulighed for nem udvinding af produktet

Øvelsen her består af to dele:

I del 1 udføres forsøg med klikreaktionen, den kobber(I)-katalyserede azid-alkyn cykloadditions-reaktion (CuAAC), og en anden reaktion, nemlig Huisgen-reaktionen. Begge reaktioners hastigheder følges ved spektrofotometri. Efterfølgende undersøges reaktionskinetikken af de to reaktioner, og disse sammenlignes.

I del 2 fokuseres på en medicinal-kemisk anvendelse af klikreaktionen. Her påsættes humant insulin en kæde der øger vandopløseligheden. Efterfølgende dokumenteres at modifikationen er lykket ved en type gelelektroforese kaldet SDS-PAGE.

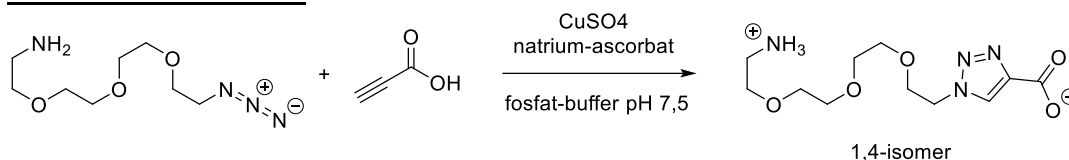
Risiko og sikkerhed

Der bæres kittel, briller og handsker under syntesen, og den organiske syntese udføres i stinkskab. Produkter og splid opsamles til kemikalieaffald. Nærmere instrukser følger på 1. øvelsesdag.

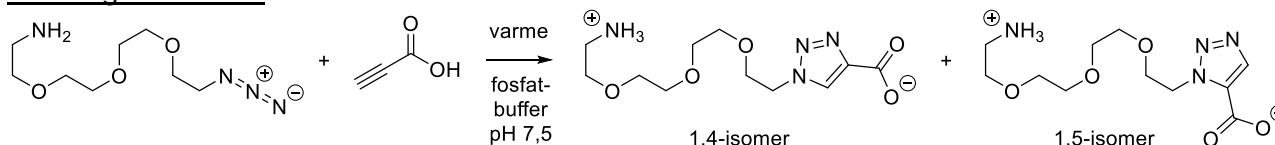
Fremgangsmåde

Del 1: Måling af reaktionshastighed for CuAAC- og Huisgen-reaktionerne med UV-spektrofotometri

A: CuAAC klik-reaktion



B: Huisgen-reaktion



Figur 1. Reaktionsskema for den kobber(I)-katalyserede azid-alkyn-cykloadditionsreaktion (A) og for varmeinduceret Huisgen-reaktion (B). I begge reaktioner reagerer 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin med propiolsyre. Huisgen reaktionen giver en blanding af 1,4- og 1,5-isomerer, hvorimod klik-reaktionen giver rent 1,4-isomerprodukt. Cu(II) reduceres med natrium-ascorbat i reaktionsblandingen til Cu(I).

Fremstilling af fosfat-buffer:

I en 250 mL målekolbe afvejes 0,690 g mononatrium-fosfat monohydrat og der fyldes op til strengen med nitrogen-afgasset vand. I en anden 250 mL målekolbe afvejes 0,890 g dinatrium-fosfat dihydrat, og der fyldes ligeledes op til strengen med nitrogen-afgasset vand, se note 1. Efter opløsning af saltene (undgå at ryste opløsningerne for kraftigt) blandes de to opløsninger langsomt under pH-kontrol med pH-meter til pH 7,5 (tilsæt mononatrium-fosfat-opløsningen til dinatrium-fosfatopløsningen).

Fremstilling af stamopløsning: Benyt handsker til at håndtere propiolsyre

Afmål 250 mL fosfat-buffer i en 250 mL målekolbe. Tilsæt 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (0,50 mL), kolben omrystes forsigtigt. Derefter tilsættes propiolsyre (0,15 mL, PAS PÅ! ÆTSENDE! BRUG HANDSKER), og der omrystes igen. Dette er den stamopløsning, der benyttes til alle reaktioner.

Huisgen-reaktion:

Til Huisgen-reaktionerne afmåles 4 portioner af 10-20 mL af stamopløsningen, som opvarmes til hhv. 45, 60, 75 og 90 grader Celsius. UV-spektrofotometrisk måling udføres ved at udtage 1 mL opløsning, som fortyndes til 100 mL vand i en målekolbe. Herefter måles absorbans med spektrofotometer ved bølglængden 218 nm. En måling på stamopløsningen (ved stuetemperatur) benyttes som reference (nulpunkt), som fratrækkes de øvrige målinger. Der laves efterfølgende målinger ca. hver anden time på øvelsesdag 1, samt ved øvelsesdag 2's og dag 3's begyndelse og afslutning, således at der samlet opnås ca. 7-8 målepunkter hen over de tre øvelsesdage (reaktionerne er langsomme).

Note 1: Nitrogen-afgasset vand er demineraliseret vand der er gennemboblet med nitrogen-gas, for at uddrive andre opløste gasser, herunder ilt, i vandet.

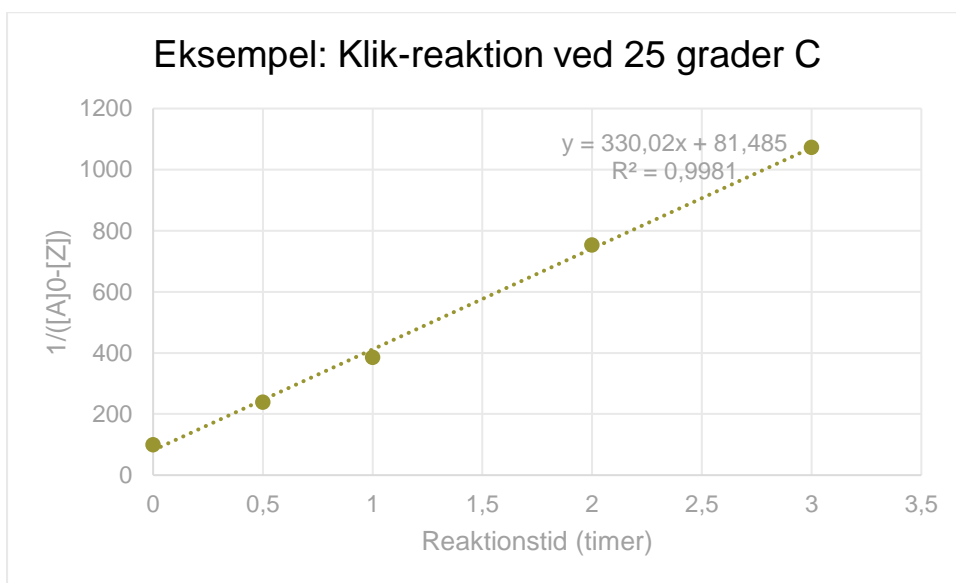
CuAAC-reaktionen

Til CuAAC-reaktionen udtages 50 mL af stamopløsningen, som overføres til en 100 mL rundbundet kolbe med slib. Der tilsættes natrium-ascorbat (0,050 g) til opløsningen under magnetomrøring. Reaktionsblandingen skal så vidt muligt holdes lukket med en glasprop for at undgå oxidation med ilt fra luften. Der laves nu en 0,02 M kobber(II)-sulfat-opløsning i en separat 25 mL konisk kolbe ved at afveje CuSO_4 -pentahydrat (0,050 g) og opløse dette i 10 mL nitrogen-afgasset vand. Der tilsættes herefter 0,625 mL af kobberopløsningen (svarende til 2,5 mol-%) til reaktionsblandingen under magnetomrøring. Direkte (efter 1 minuts omrøring) efter tilsætningen udtages 1 mL af reaktionsblandingen, og der fortyndes igen til 100 mL og måles absorbans spektrofotometrisk som ovenfor ved 218 nm. Denne måling benyttes som reference (nulpunkt), som fratrækkes de øvrige målinger. Der laves måling efter 30 minutter og efter 1 time, og efterfølgende målinger hver time. Reaktionen forløber over ca. 3-5 timer ved 25 °C.

Udregninger del 1:

Ekperimentelle studier viser at reaktionen er en 2. ordens reaktion, se note 2.

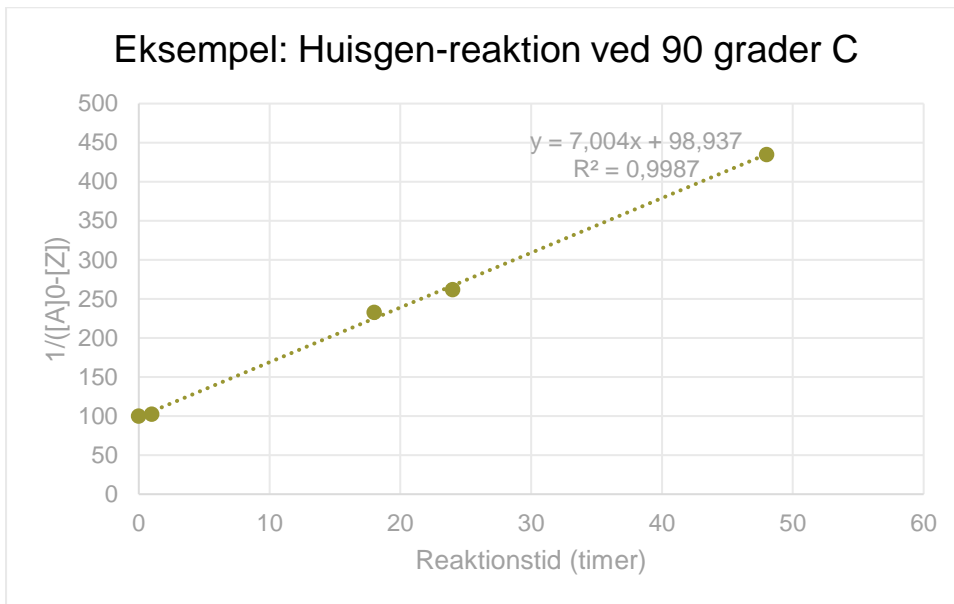
Hastighedskonstanten for 2.-ordens-reaktionerne findes som hældningskonstanten fra et plot af $1/([A]_0 - [Z])$ mod reaktionstiden. Startkoncentrationen af azid (eller alkyn), $[A]_0$ er 0,010 M, og koncentrationen af produkt, $[Z]$, findes ud fra absorbansen (Lambert-Beers lov: $A = \epsilon \cdot C \cdot l$; benyt som udgangspunkt $\epsilon_{\text{Huisgen}} = 3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ og $\epsilon_{\text{CuAAC}} = 6700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).



Note 2: En video der forklarer hvordan man finder hastighedskonstanter og forklarer 2. Ordens reaktionskinetik, er her: <https://www.youtube.com/watch?v=w5Ad9jqaddg>.

En video der forklarer Lambert Beers lov er her:

<https://www.youtube.com/watch?v=C8OtdKVqBEc>



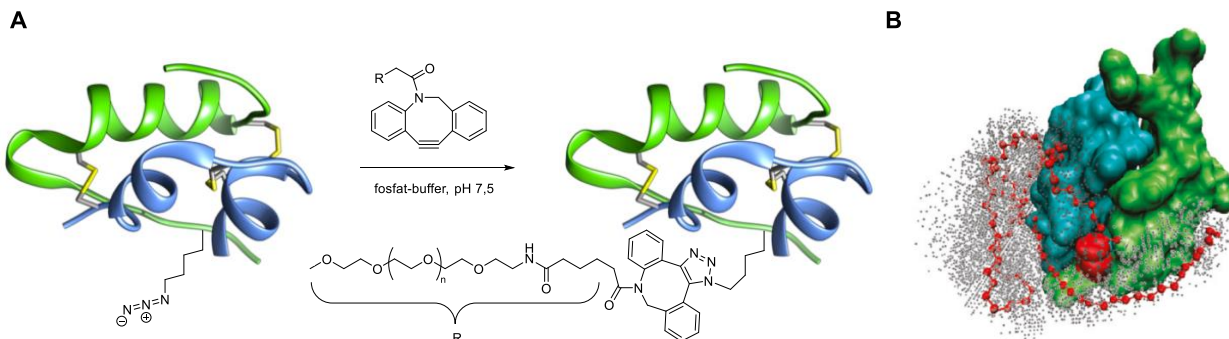
Ekstrapolation af hastighedskonstanten for Huisgen-reaktionen til $T=25$ grader Celsius udføres fra et Arrhenius plot, som laves for de fire reaktionstemperaturer (45, 60, 75 og 90 grader Celsius) ved at plotte $\ln(k)$ mod $1/T$. Herved kan reaktionshastigheden for Huisgen- og klik-reaktionerne sammenlignes, note 3.

Note 3: En video der forklarer Arrhenius ligningen og Arrhenius plot, kan findes her:

<https://www.youtube.com/watch?v=DAG8iDN8KR4>

Fremgangsmåde

Del 2: Kemisk modifikation af insulin med kobber-fri klik-kemi



Figur 2. Klik-reaktion imellem azido-modificeret insulin og dibenzo-cyklooktyn med poly(ethylen glykol)-kæde, dvs R er i tilfældet her poly(ethylen glykol)-kæden, se note 4. (A) Reaktions-skema. (B) Molekylemodel for produktet. Insulins A-kæde er vist med blå farve; insulins B-kæde med grøn farve; insulins disulfid-brøer med gul farve; poly(ethylen glykol)-kæden med rød farve; og vandmolekyler med grå prikker (kilde: C. Yang et al. *Biochemistry* **2011**, *50*, s. 2585-2593).

I et hætteglas afvejes B29-Azido-modificeret human insulin (1 mg), og stoffet opløses i 1,0 mL af fosfat-bufferen fra deløvelse 1 (pH 7,5) - ryst ikke opløsningen for kraftigt da den kan komme til at skumme. Når insulinen er fuldstændig i opløsning udtages 0,4 mL af insulin-opløsningen som tilsættes 0,4 mL af en opløsning af poly(ethylen glykol 5000)-dibenzo-cyklooktyn i et hætteglas, der markeres med "5k". En anden portion på 0,4 mL af insulin-opløsningen tilsættes 0,4 mL af en opløsning af poly(ethylen glykol 10.000)-dibenzo-cyklooktyn i et andet hætteglas, der markeres med "10k". De to klik-reaktionsblandinger reagerer ved henstand i 2 timer ved stuetemperatur.

Reaktionsprodukterne fra de to klik-reaktioner analyseres vha. SDS-PAGE. Instruktion hertil gives separat.

Note 4: poly(ethylen glykol) forkortes ofte PEG. Det er en polymer af varierende kædelængde, hvor strukturen $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$ er gentaget et antal gange, angivet med n, hvor n er antallet af monomerer. PEG 5000 og PEG 10.000 henviser til molekylvægten. PEG 5000 har i gennemsnit 113 monomer enheder, mens PEG 10.000 i gennemsnit har dobbelt så mange monomerer. Jo længere kædelængde, jo mere hydrofil.