

CHEMIA BIOORTOGONALNA
– NOWA PERSPEKTYWA DLA CHEMII ORGANICZNEJ
BIOORTHOOGONAL CHEMISTRY – NEW PERSPECTIVE
FOR ORGANIC CHEMISTRY

Katarzyna Miszczak

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
e-mail: katarzyna.edyta.miszczak@student.uj.edu.pl

*Praca wyróżniona w konkursie Krakowskiego Oddziału PTChem na konferencji
studenckiej Horyzonty Nauki – Forum prac Dyplomowych 2017*

Abstract

Wprowadzenie

1. Chemia bioortogonalna
 - 1.1. Ogólny mechanizm ligacji
 - 1.2. Reakcja Staudingera
 - 1.2.1. Ligacja Staudingera
 - 1.2.2. Inne przykłady reakcji bioortogonalnych
 2. Reakcje cykloaddycji stosowane w chemii bioortogonalnej
 - 2.1. 1,3-Dipolarna cykloaddycja azydków do alkinów
 - 2.2. Reakcje Dielsa-Aldera
 - 2.2.1. Reakcje Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji
 - 2.2.2. Reakcje Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji
 3. Zastosowanie bioortogonalnych cykloaddycji do obrazowania biocząsteczek i leków
- Uwagi końcowe
- Piśmiennictwo cytowane
-
-



Katarzyna Miszczak – w 2015 r. rozpoczęła studia licencjackie na kierunku chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pracę licencjacką wykonywała w Zespole Chemii Związków Heterocyklicznych i Metaloorganicznych pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Pałasz. Tematyka obecnie prowadzonych badań dotyczy izolacji związków naturalnych z materiału roślinnego oraz reakcji bioortogonalnych.

ABSTRACT

This work is about bioorthogonal chemistry as a chemistry of reactions taking place in the living, in particular human, organism environment. In the search for reactions that can occur under conditions, the focus is mainly on the reactions of molecules that do not occur naturally in the body. Then, to have any application, generally for the purpose of using this reactions to locate the accumulation spots of the selected substance, one molecule is covalently bonded to the biomarker molecule, the second binds to the indicator molecule, which is frequently fluorescein.

Among a numerous examples of reactions that were designed during the short history of bioorthogonal chemistry, there are mainly reactions involving organic azides, which are not naturally present in the human body. An example of such a reaction is the Staudinger ligation. Subsequent modifications include mainly the 1,3-dipolar addition of azides to alkynes, catalyzed by copper(I) ions. The instability and toxicity of this catalyst has forced further innovations in bioorthogonal reactions. One of them is the use of alkynes with high angular stress, which causes a significant reduction in the activation energy of the process, that it is unnecessary to use a catalyst. Another example of the bioorthogonal reactions are Diels-Alder reactions. The interest in these reactions is not diminishing for several reasons. One of them is the fact that as a result of a simple reaction two new carbon-carbon bonds (or others, for the HDA reaction) occur. Furthermore, many of these reactions occur at standard temperature, without additional heating. Moreover, the possibility of numerous modifications of the skeleton and functional groups and the substituents of dienes and dienophils facilitates carrying out these reactions in the aquatic environment. At the end, the article presents examples of the application of cycloaddition reactions in bioorthogonal chemistry.

Keywords: bioorthogonal chemistry, bioorthogonal ligation, Staudinger ligation, 1,3-dipolar cycloaddition, Diels-Alder reactions

Słowa kluczowe: chemia bioortogonalna, bioortogonalna ligacja, ligacja Staudingera, 1,3-dipolarna cykloaddycja, reakcja Dielsa-Aldera

WPROWADZENIE

Wraz z postępowaniem cywilizacji dążenie do coraz to lepszych rozwiązań technologicznych jest wyzwaniem dla różnych dziedzin nauki, które muszą iść zgodnie z duchem czasu. Jest to również wyzwanie dla chemików organicznych zajmujących się syntezą organiczną. Większość reakcji organicznych przeprowadza się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak chlorek metylenu, chloroform, toluen, pirydyna czy też proste alkohole. Każda reakcja jest przeprowadzana w specyficznych warunkach, takich jak odpowiednia temperatura, ciśnienie, obecność lub brak wody, odpowiednie ciśnienie. Nie można także zapomnieć o atmosferze, w jakiej przebiega reakcja – należy uwzględnić dostęp tlenu czy pary wodnej do środowiska reakcji.

Trendem, jaki obserwuje się w XXI wieku w chemii organicznej są poszukiwania reakcji chemicznych, które mogą zachodzić w żywym organizmie niezależnie od procesów biochemicznych tam przebiegających. To one zapoczątkowały ukierunkowanie się części laboratoriów na świecie w stronę badań nad reakcjami zachodzącymi w wodzie jako rozpuszczalniku. Głównym zastosowaniem dla tych reakcji jest ich wykorzystywanie do badania metabolizmu leków lub różnych biocząsteczek oraz zastosowania do określania dystrybucji leków w komórce. Bioortogonalna ligacja ma na celu znakowanie obrazowanych cząsteczek chemicznym reporterem. Reakcje te oprócz wykorzystania wody jako rozpuszczalnika muszą zachodzić przy odpowiedniej wartości pH zbliżonej do warunków fizjologicznych, czyli w zakresie pH 4,5–7,5. Ponadto na przebieg reakcji bioortogonalnych nie powinna mieć wpływu obecność utleniaczy i aktywnych aminokwasów [1]. W tej właśnie dziedzinie pojawiają się duże perspektywy dla chemików, którzy muszą szukać odpowiednich nietoksycznych reagentów oraz tak dobierać warunki reakcji, aby były najbliższe warunkom w organizmie ludzkim czyli tak zwanym warunkom fizjologicznym.

Naukowcy coraz częściej opracowują nowe metody pozwalające na obserwację procesów zachodzących w komórkach organizmów żywych. Znanych jest szereg znaczników, które ułatwiają śledzenie zachodzących procesów. Są to między innymi kodowane cząsteczki reporterowe służące do monitorowania białkowych produktów w organizmie [2]. Przykładem takiego białka jest białko GFP, z języka angielskiego *Green fluorescent protein*. Jest to naturalnie występujące białko wykazujące jasnozieloną fluorescencję przy ekspozycji na światło z zakresu od niebieskiego do ultrafioletowego. W 2008 roku Martin Chalfi, Osam Shimomura i Roger Tsien otrzymali nagrodę Nobla za odkrycie i badania przeprowadzone na nim. To odkrycie jeszcze bardziej wpłynęło na rozwój chemii bioortogonalnej. Rozpoczęto badania nad przyłączaniem związków organicznych do białek i badania mechanizmów procesów białkowych. Dzięki temu powstał nowy dział w chemii organicznej i biologii opisywany jako chemia bioortogonalna, która ma łączyć syntezę organiczną z badaniami komórkowymi danych szlaków metabolicznych.

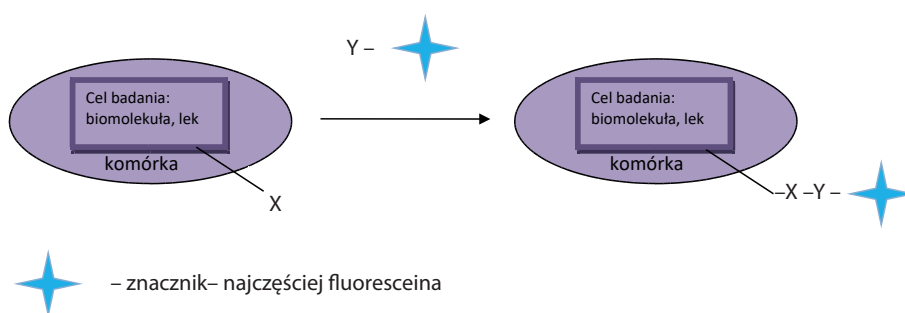
1. CHEMIA BIOORTOGONALNA

Termin chemia bioortogonalna pojawił się po raz pierwszy w pracy Carolyn R. Bertozzi w 2003. Chemia bioortogonalna obejmuje reakcje, które nie zakłócają reakcji biologicznych zachodzących w organizmie [3]. Przede wszystkim reakcje te muszą zachodzić w środowisku wodnym, ponieważ każdy organizm składa się w większości z wody. Substraty muszą reagować ze sobą szybko i selektywnie w warunkach fizjologicznych i nie oddziaływać z różnymi substancjami znajdującymi się w organizmie.

Celem chemii bioortogonalnej jest znakowanie cząsteczek chemicznym reporterem, który jest bioortogonalny i specyficzny dla reakcji bioortogonalnej a tym samym specyficzny dla organizmu żywego. W chemii bioortogonalnej klasyczna kolba reakcyjna została zastąpiona komórką biologiczną, a reakcje bioortogonalne są cennymi narzędziami służącymi do badania procesów metabolizmu leków lub biocząsteczek.

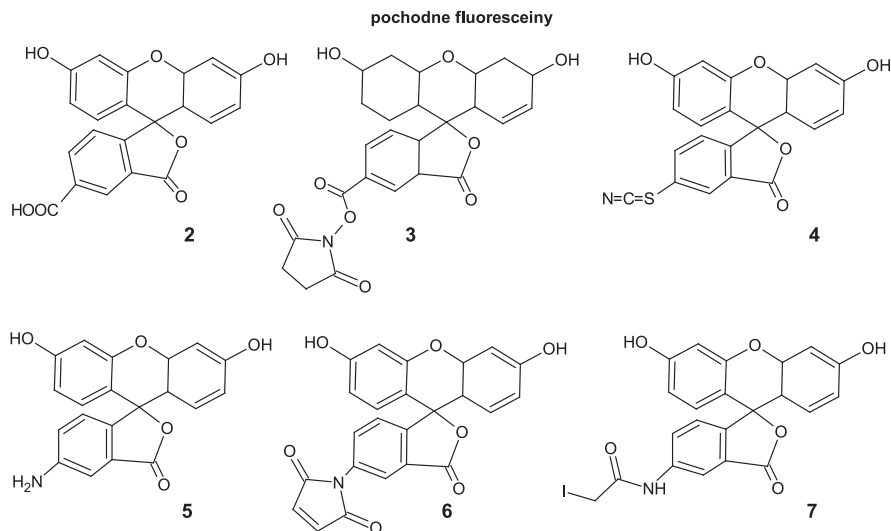
1.1. OGÓLNY MECHANIZM LIGACJI

Mechanizm reakcji bioortogonalnej można sprowadzić do kilku etapów. Po pierwsze musi istnieć związek, który jest specyficzny i nie reaguje z innymi związkami znajdującymi się w komórce biologicznej. Ponadto, taki związek powinien mieć odpowiednie grupy funkcyjne, poprzez które może być utworzone wiązanie z barwnikiem – najczęściej jest to fluoresceina (Schemat 1). Badany obiekt łączy się z drugim reagentem. W wyniku przeprowadzonej reakcji bioortogonalnej badany obiekt zostaje połączony ze znacznikiem. Dzięki takiemu nowemu związkowi możemy śledzić metabolizm cząsteczki oraz miejsce jej akumulacji.



Schemat 1. Ogólny schemat ligacji w chemii bioortogonalnej

Scheme 1. General scheme of ligation in bioorthogonal chemistry

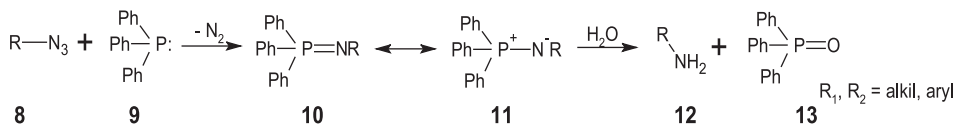


Rysunek 1. Fluoresceina i różne reaktywne pochodne fluoresceiny
 Figure 1. Fluorescein and various reactive derivatives of fluorescein

Aby przyłączyć znacznik do jednego z reagentów, w chemii bioortogonalnej wykorzystuje się aktywne pochodne fluoresceiny (Rys. 1). Pochodne **2**, **3** i **4** reagują ze związkami posiadającymi grupę aminową. Pochodna **5** ulega z łatwością reakcjom, w których drugim reagentem jest reaktywna pochodna kwasu karboksylowego. Ostatnie dwie struktury **6** i **7** reagują ze związkami posiadającymi grupy tiolowe [4].

1.2. REAKCJA STAUDINGERA

Pierwszym przykładem reakcji, która po modyfikacjach została zastosowana w chemii bioortogonalnej jest reakcja przeprowadzona w 1919 roku przez Hermanna Staudingera. Jest to reakcja azydku **8** z tryfenylofosfiną **9** z utworzeniem pierwszorzędowej aminy **12** (Schemat 2) [5].



Schemat 2. Reakcja Staudingera, jako przykład pierwszej reakcji bioortogonalnej
 Scheme 2. Reaction Staudinger, as an example of the first bioorthogonal reaction

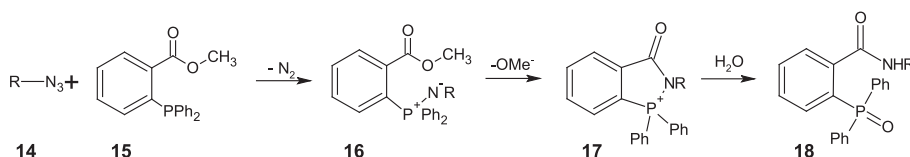
Jak widać na Schemacie 2 następuje atak nukleofilowy atomu fosforu tryfenylofosfiny **9** na atom azotu w azydku **8** z utworzeniem iminofosforanu **10** i wydzielaniem cząsteczki azotu. Utworzona imina **10** istnieje również w innej formie

rezonansowej – aza-ylidu **11**. Pod wpływem wody ulega on hydrolizie do pierwszorzędowej aminy **12** oraz tlenku trifenylfosfiny **13** (Schemat 2). Pomimo szerokiego zakresu stosowalności klasycznej reakcji Staudingera niska stabilność aza-ylidu **11** mogącego ulegać hydrolizie, jak również wrażliwości związków fosforu(III) na wilgoć w powietrzu ograniczyły zastosowanie tej wersji reakcji w wodnych układach biologicznych.

Reakcje bioortogonalne powinny zachodzić pomiędzy związkami, które nie występują w organizmie człowieka, dlatego bardzo dobrym przykładem tego typu reakcji jest reakcja przedstawiona na powyższym schemacie. Zastosowany azydek nie występuje w komórkach, ponadto grupa $-N_3$ jest stabilna w warunkach fizjologicznych oraz jest małą grupą, którą można łatwo połączyć z większą białkową. Trifenylfosfina także nie występuje w komórkach organizmu oraz jest niereaktywna z innymi związkami biologicznymi, dlatego również jest dobrym przykładem cząsteczki do zastosowania w chemii bioortogonalnej.

1.2.1. Ligacja Staudingera

Zastosowanie reakcji chemicznych w komórkach biologicznych wymaga, aby powstające połączenia były stabilne w warunkach fizjologicznych. Dlatego zaproponowano modyfikację reakcji Staudingera, a dokonała tego Carolyn Bertozzi. Zastąpiła trifenylfosfinę związkiem podobnym do pierwotnego ale posiadającym tzw. elektrofilową pułapkę. Schemat 3 obrazuje ligację Staudingera [6].



Schemat 3. Ligacja Staudingera zmodyfikowana przez C.R. Bertozzi

Scheme 3. Ligation Staudinger modified by C.R. Bertozzi

Elektrofilową pułapkę stanowi grupa estrowa znajdująca się w pozycji *ortho* w podstawniku arylovym. Atom azotu aza-ylidu **16** atakuje grupę karbonylową estru, zapobiegając hydrolizie ylidu poprzez utworzenie związku zawierającego pięcioczłonowy pierścień. Hydroliza wiązania P-N prowadzi do utworzenia amidu **18** zawierającego tlenek fosfiny. Aby zademonstrować zastosowanie tej reakcji jako bioortogonalnego narzędzia, Bertozzi użyła fluorescencyjny azydek pochodną glikanów i fosfiny z przyłączoną do niej biotyną [6].

Schemat 3 ukazuje jak niewielka zmiana wprowadzona do jednego substratu powoduje powstawanie zupełnie innej klasy związków. W klasycznej reakcji Staudingera powstawała amina pierwszorzędowa, natomiast w ligacji Staudingera otrzymuje się amid.

1.2.2. Inne przykłady reakcji bioortogonalnych

Kolejnymi przykładami bioortogonalnej ligacji są reakcje przedstawione w Tabeli 1. Komentarze zawierają uwagi odnośnie zastosowania danej metody jako reakcji bioortogonalnej. Każda z tych reakcji posiada jakieś ograniczenia ale pomimo to stosowana jest do bioortogonalnej ligacji, ponieważ nie znaleziono dotychczas dla danego przypadku obrazowania lepszego „narzędzia”. Oprócz ligacji Staudingera do reakcji bioortogonalnych zaliczamy kondensację związków organicznych takich jak alifatyczne ketony czy aldehydy, a także cyjanobenzotriazole.

Tabela 1. Wybrane reakcje, które znalazły zastosowanie w chemii bioortogonalnej
Table 1. Selected reactions that are used in bioorthogonal chemistry

Typ reakcji	Reagent 1	Reagent 2	Komentarz
kondensacja aldehydów/ketonów		H_2N-O-R	addukty są podatne na hydrolizę; jako katalizator stosuje się anilinę
			reakcja prowadzi do bardziej stabilnych wiązań C-C
Ligacja Staudingera	$R-N_3$		fosfiny są podatne na utlenianie
kondensacja cyjanobenzotriazoli			możliwe uboczne reakcje z wolnymi tiolami

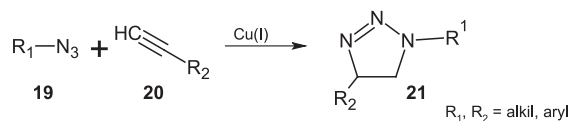
Oprócz przedstawionych powyżej przykładów reakcji bioortogonalnych w obecnym czasie zwrócono szczególną uwagę na reakcje cykloaddycji.

2. REAKCJE CYKLOADDYCJI STOSOWANE W CHEMII BIOORTOGONALNEJ

2.1. 1,3-DIPOLARNA CYKLOADDYCJA AZYDKÓW DO ALKINÓW

Badania nad 1,3-dipolarną cykloaddycją prowadził w latach 60. XX wieku Ralf Huisgen [7]. Jest to reakcja stosowana do regioselektywnej i stereoselektywnej syntezy pięciocłonowych pierścieni heterocyklicznych [8].

1,3-dipolem mogą być związki zawierające jako atom centralny azot np.: ylidy, nitryle, iminy nitrylu, tlenki nitrylu, azydki, ylidy azometinowe, nitrony. Dipolarofilami są najczęściej alkeny i alkiny lub ich heteroanalogi [9].

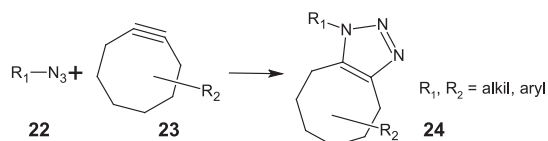


Schemat 4. Reakcja 1,3-dipolarnej addycji azydków do alkinów z użyciem katalitycznych ilości soli miedzi(I)
 Scheme 4. 1,3-Dipolar cycloaddition of azides and alkynes with catalytic amounts of Cu(I) salts

Schemat 4 przedstawia reakcję azydku **19** jako 1,3-dipola z alkinem **20** jako dipolarofilem, w wyniku której otrzymuje się pięcioczłonowy pierścień triazolu **21**. Ten typ reakcji został opisany przez Huisgena w 1976 roku [10].

Omawiana reakcja zazwyczaj jest prowadzona w podwyższonej temperaturze. Dlatego Meldal i Sharpless niezależnie opracowali metodę katalizowania reakcji wykorzystując jony miedzi(I). Odkryli oni, że jony miedzi(I) znacząco wpływają na szybkość powyższej reakcji i nazwano tą reakcję „*copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*” a dla uproszczenia przyjęto skrót CuAAC (Schemat 4). Reakcja ta jest przykładem tak zwanych reakcji „*click*”, [10, 11]. Niestety reakcje CuAAC nie mogą być używane w chemii bioortogonalnej, ponieważ jony miedzi(I) są szkodliwe dla organizmów żywych.

Pracując nad zastosowaniem reakcji azydków i alkinów w chemii bioortogonalnej chemicy zaproponowali modyfikację pozwalającą na przeprowadzenie reakcji bez użycia toksycznych jonów miedzi(I). Zaproponowano zastosowanie do reakcji z azydkami cyklicznych alkinów posiadających w pierścieniu siedem lub osiem atomów węgla (Schemat 5).

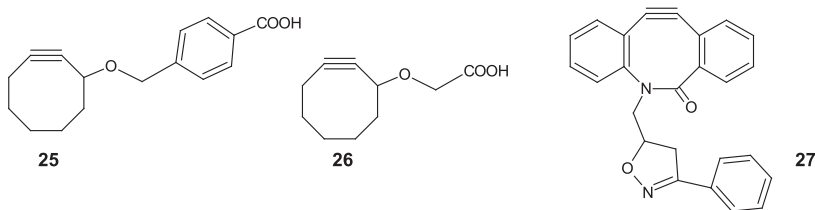


Schemat 5. Reakcje cykloaddycji azydków i pochodnych cyklooktynu promowanych napięciem kątowym pierścienia cyklooktynu

Scheme 5. Cycloaddition reaction of azides and cyclooctyne derivatives promoted by strain of cyclooctyne ring

Schemat 5 to reakcja azydku **22** z cyklooktynem **23** w wyniku, której powstają 1,2,3-triazole **24**. W pierścieniu cyklooktynu występuje duże naprężenie kątowe, które stanowi siłę napędową reakcji bez potrzeby użycia szkodliwej dla komórek biologicznych jonów miedzi(I). Tę reakcję nazwano „*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*” – skrót SPAAC [12]. W układzie cyklooktynu na atomach węgla połączonych wiązaniem potrójnym występuje hybrydyzacja sp² co wymusza geometrię liniową i kąty 180° w tym fragmencie cząsteczki. Cząsteczka cyklooktynu jest cykliczna, następuje odkształcenie od liniowości i pojawia się naprężenie kątowe. Po zajściu reakcji następuje zmniejszenie naprężenia kątowego dzięki zmianie hybrydyzacji atomów węgla z sp² na sp³. Stosując takie substraty obniżamy energię aktywa-

cji reakcji, która wymagała użycia jonów miedzi(I) jako katalizatora. Azydek **22** jak i cyklooktyn **23** nie reagują z żadnymi biocząsteczkami występującymi w komórce a zatem są chemoselektywne. Ponadto w komórce są wyjątkowymi molekułami, ponieważ w żywym organizmie nie znajdziemy podobnych do nich związków. To pozwoliło na wprowadzenie tej reakcji do grona kilkunastu ligacji należących do „narzędzi w skrzynce z narzędziami” jaką dysponuje chemia bioortogonalna. Jednakowoż naukowcy natrafili na pewien problem; okazało się że cyklooktyny słabo rozpuszczają się w wodzie. W nawiązaniu do tego problemu, wprowadzane są różnego rodzaju modyfikacje cyklooktynu aby zwiększyć rozpuszczalność (Rys. 2).

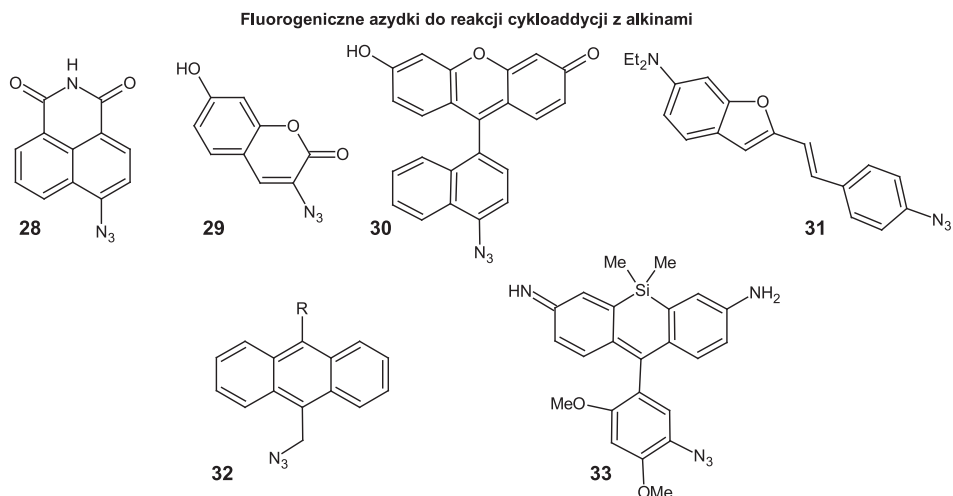


Rysunek 2. Wybrane trzy związki stosowane w cykloaddycji, uszeregowane wraz ze wzrostem rozpuszczalności w środowisku wodnym

Figure 2. Three selected compounds used in cycloaddition, ranked by increasing solubility in the aquatic environment

Na Rysunku 2 pokazano trzy związki wykorzystywane w reakcji SPAAC według rosnącej rozpuszczalności w warunkach fizjologicznych. Więcej przykładów takich związków można znaleźć w artykule zamieszczonym w czasopiśmie *Topics in Current Chemistry* [12].

Aby umożliwić wizualizację biomolekuł w organizmie żywym w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków i alkinów wykorzystuje się gotowe małowymagające fluorogeniczne substraty. Na Rysunku 3 ukazane są odpowiednie azydki **28–33**, jak kilka przykładów alkinów **34–37**. Przedstawione reagenty wykazują fluorescencję, dzięki czemu możemy śledzić przebieg danej reakcji zachodzącej w komórce biologicznej [12].

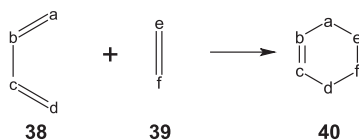


Rysunek 3. Fluorogeniczne substraty do 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów

Figure 3. Fluorogenic substrats for 1,3-dipolar cycloaddition azides with alkynes

2.2. REAKCJE DIELSA-ALDERA

Reakcje Dielsa-Aldera (DA) zostały opisane w 1928 roku przez dwóch chemików: Otto Dielsa i Kurta Aldera, którzy otrzymali nagrodę Nobla w 1950 roku za to odkrycie. Reakcja ta jest jednym z bardziej ekonomicznych przekształceń stosowanych w chemii organicznej. W wyniku jednej przemiany powstają dwa nowe wiązania węgiel-węgiel. Jest jedną z głównych reakcji prowadzącą do otrzymania połączeń karbocyklicznych jak i heterocyklicznych. Nazywa się ją także reakcją *one step*, ponieważ zachodzi jednoetapowo [14].

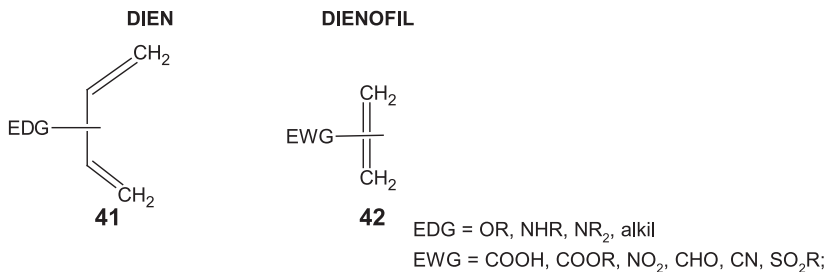


Schemat 6. Ogólny schemat reakcji Dielsa-Aldera
 Scheme 6. General scheme of Diels-Alder reaction

Polega na cykloaddycji podstawionego dienu **38** do alkenu **39** z utworzeniem pochodnych cykloheksenu **40**. Reakcja DA jest cennym narzędziem syntetycznym ponieważ charakteryzuje się wysoką regio-, diastereo- jak i w niektórych przypadkach enancjoselektywnością. Reakcja cykloaddycji DA jest także stereospecyficzna. Dzięki temu stereochemia dienofila zostaje niezmieniona. Zatem z dienofila o konfiguracji *cis* lub *trans* otrzymuje się odpowiednio *cis* lub *trans* diastereoizomery jako produkty tej reakcji [14].

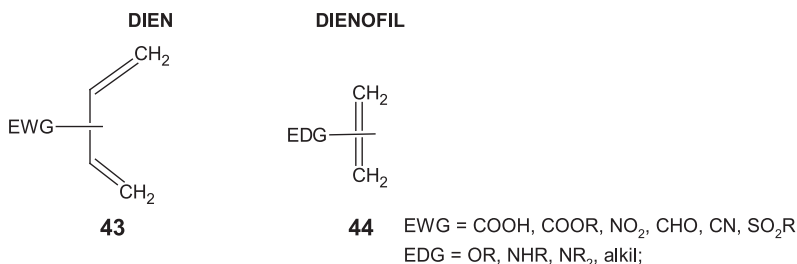
Molekularny opis reakcji DA – cykloaddycji $[4\pi+2\pi]$, opiera się na nakładaniu orbitali granicznych HOMO i LUMO substratów. Znane są dwa typy reakcji DA. Pierwszy to reakcja klasyczna, czyli z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym. Drugą z kolei nazywa się reakcją z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym.

W klasycznej reakcji DA dien powinien posiadać podstawniki elektronodonorowe – EDG z ang. *elektron donating group* oraz konformację *s-cis*. Z kolei dienofil powinien być wyposażony w grupę elektroakceptorową – EWG z ang. *elektron withdrawing group* [15] (Rys. 4).



Rysunek 4. Dieny i dienofile wykorzystywane w klasycznej reakcji Dielsa-Aldera
 Figure 4. Diens and dienofiles used in the classic Diels-Alder reaction

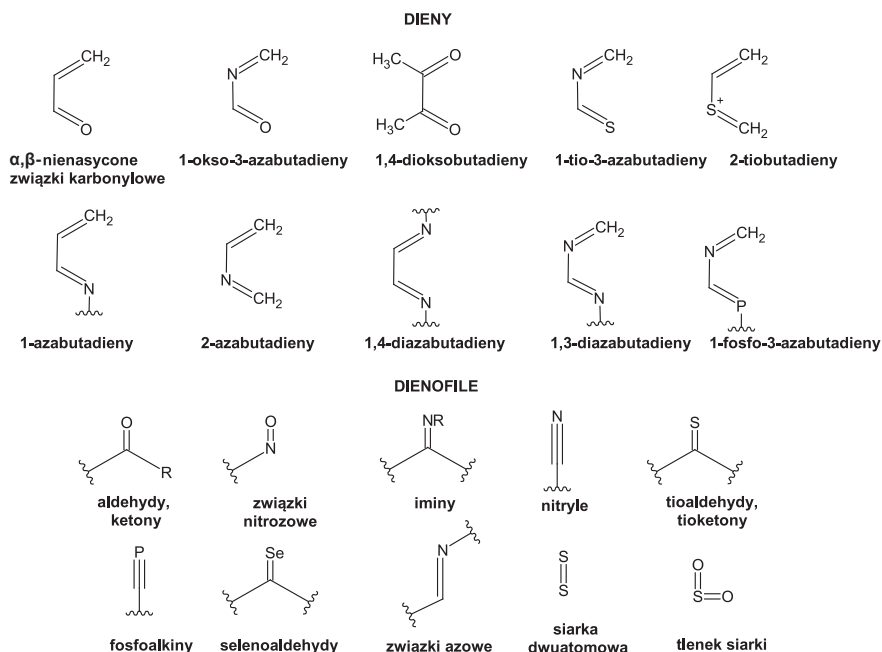
Reakcja z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym jest charakterystyczna dla dienów posiadających deficyt ładunku ujemnego, co zapewniają podstawniki elektroakceptorowe, natomiast dienofil musi posiadać grupy elektronodonorowe (Rys. 5).



Rysunek 5. Dieny i dienofile wykorzystywane w reakcji Diels-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym

Figure 5. Diens and a dienofiles used in the inverse-electron-demand Diels-Alder reaction.

W reakcji DA często stosuje się substraty zawierające heteroatomy takie jak azot, tlen czy siarkę. Jest to tak zwana reakcja hetero-Diels-Aldera w skrócie HDA (Rys. 6).



Rysunek 6. Przykładowe dieny i dienofile wykorzystywane w reakcji hetero-Diels-Aldera

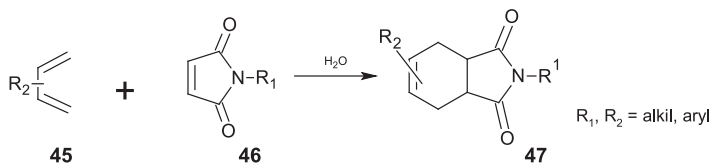
Figure 6. Example of diens and a dienofiles used in the hetero-Diels-Alder reaction

W 1980 roku Ronald Breslow odkrył, że reakcja DA zachodzi znacznie szybciej i z większą *endo/egzo* selektywnością w wodzie w porównaniu z rozpuszczalnikami organicznymi [16]. Reakcje DA zaliczamy do najważniejszych reakcji stosowanych w chemii bioortogonalnej, ponieważ zachodzą one z wysokimi wydajnościami w środowisku wodnym. Substraty stosowane w reakcji DA, są specyficzne, związki

tego typu nie występują w komórkach biologicznych. W związku z tym, dien i dienofil mogą się selektywnie odnaleźć i połączyć.

2.2.1. Reakcje Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji

Często używanym dienofilem w tego typu reakcjach jest imid kwasu bursztynowego **46**, który z łatwością reaguje ze sprzężonymi dienami **45** w łagodnych warunkach z utworzeniem pochodnej **47** (Schemat 7) [1]. Jedynym ograniczeniem tej reakcji jeśli chodzi o jej wykorzystanie w układach biologicznych jest fakt, że imid kwasu bursztynowego może reagować ze znajdującymi się tam związkami takimi jak aminokwasy posiadające nukleofilowe wolne grupy aminowe lub grupy tiohydroksylowe. Nie zmienia to faktu, że reakcja ta znalazła zastosowanie w znakowaniu kwasów nukleinowych i białek [1].

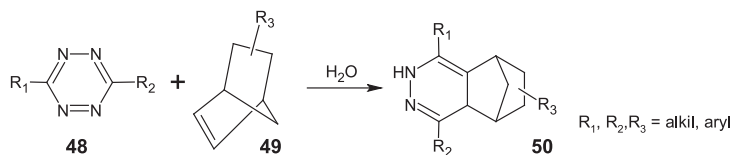


Schemat 7. Reakcja Dielsa-Aldera z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym
Scheme 7. Diels-Alder reaction with normal-electron-demand

Obecnie stosuje się niewiele reakcji DA z normalnym zapotrzebowaniem elektronowym jako bioortogonalnych cykloaddycji z uwagi na substraty, które łatwo mogą reagować ze związkami występującymi w środowisku komórki [1].

2.2.2. Reakcje Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym stosowane do bioortogonalnej ligacji

W reakcjach DA z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym bardzo często jako dien stosuje się pochodne 1,2,4,5-tetrazyny z powodu, iż ten układ heterodienu jest ubogi elektronowo. 1,2,4,5-Tetrazyna reaguje z reaktywnymi alkenami, takimi jak *trans*-cyklookten, norbornen czy cyklopropen [17]. Reaktywność tych dienofili wynika z naprężenia kąтового w odpowiednich pierścieniach.

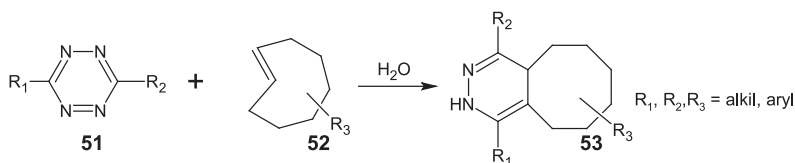


Schemat 8. Reakcja Hetero-Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym – tetrazyny z norbornenem [17]

Scheme 8. Inverse-Electron-Demand Hetero-Diels–Alder reaction of tetrazine with norbornene [17]

W 2008 roku Devaraj i Blackman niezależnie od siebie, opisali bioortogonalne reakcje z udziałem tetrazyny **48** i norbornenu **49** (Schemat 8) [17, 18].

Ponadto opisali także drugą reakcję przedstawioną na Schemacie 9.



Schemat 9. Reakcja Hetero-Dielsa-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym tetrazyny z *trans*-cyklooktenem [18]

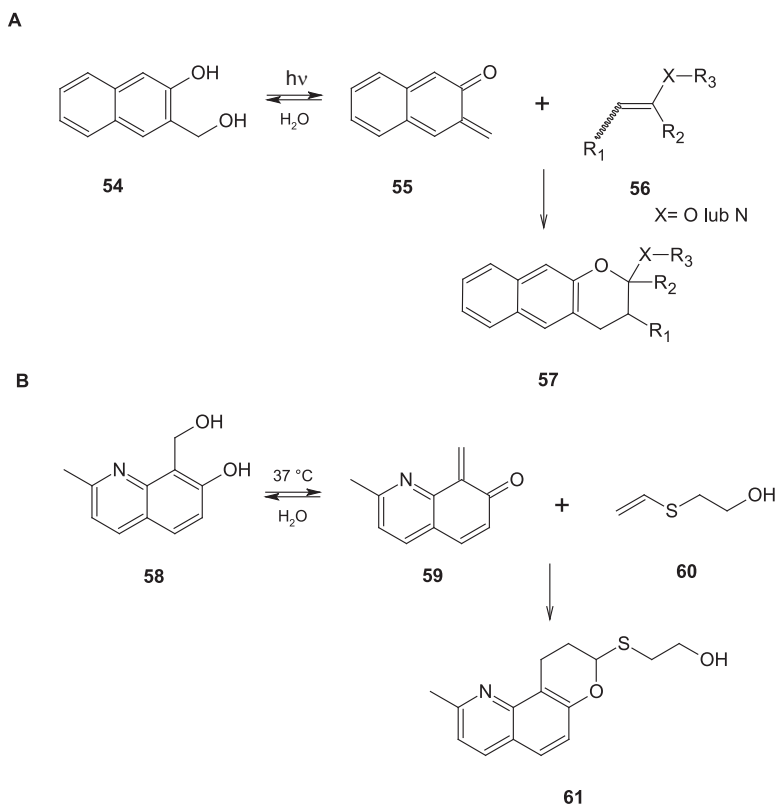
Scheme 9. Inverse-electron-demand Hetero-Diels–Alder reaction of tetrazine with *trans*-cyclooctene [18]

Tetrazyna **51** ulega reakcji DA z *trans*-cyklooktenem **52** w środowisku wodnym (Schemat 9) [18].

Porównując powyższe substraty, należy podkreślić, iż reakcja tetrazyny **48** z norbornenem **49** zachodzi znacznie wolniej niż z *trans*-cyklooktenem **52**, jednak norbornen **49** charakteryzuje się większą stabilnością [19].

Reakcje opisane powyżej zachodzą szybko, jednak duże rozmiary substratów: *trans*-cyklooktenu i norbornenu limitują ich użyteczność w praktycznym zastosowaniu przy znakowaniu badanych obiektów.

Innymi reakcjami HDA, które znalazły zastosowanie w chemii bioortogonalnej są cykloaddycje, w których rolę heterodieniu pełnią 1-oksa-1,3-butadieny a rolę dienofila etery winylowe. Układ 1-oksa-1,3-butadienu znajduje się w strukturze *o*-metylidenonaftochinonu, który to związek szybko i selektywnie reaguje w reakcji HDA z bogatym w elektrony dienofilem (Schemat 10A). Ta reakcja jest wysoce selektywna i przebiega bez zakłóceń w warunkach wodnych. Tioetery winylowe są małymi cząsteczkami stabilnymi chemicznie *in vivo*, dzięki czemu nadają się do zastosowania jako bioortogonalne reportery chemiczne, które można skutecznie sprzęgać z różnymi biomolekułami [20].

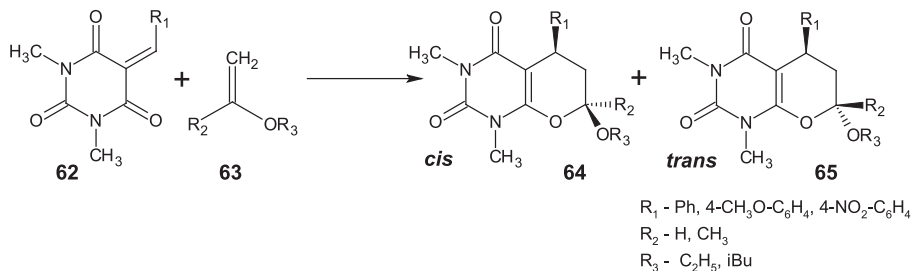


Schemat 10. Reakcja pochodnych 1-oksa-1,3-butadienów z eterami winylowymi

Scheme 10. Reaction of derivatives 1-oxa-1,3-butadienes reaction with vinyl ether

Do utworzenia układu *o*-metylidenaftochinonu **55** niezbędne jest promieniowanie UV co uniemożliwia zastosowanie tej reakcji w chemii bioortogonalnej. W 2013 zostały zmodyfikowane struktury heterodienu **55** i dienofila **56** tak aby spełniały one odpowiednie warunki dla bioortogonalnej cykloaddycji. Zastosowano pochodną *o*-metylidenoquinolinochinonu **59** zawierającą atom azotu. Dzięki obecności atomu elektroujemnego pierwiastka w strukturze dienu znacznie zwiększyła się jego reaktywność oraz hydrofilowość. Natomiast drugim substratem był tioeter winylowy **60**, który charakteryzuje się małymi rozmiarami jak i stabilnością chemiczną oraz tym, iż jest dienofilem bogatszym w elektrony (Schemat 10B) niż wcześniej zastosowany eter winylowy. Reakcja przedstawiona na Schemacie 10B przebiegała w wodzie oraz w temperaturze $37^\circ C$. Warto zauważyć iż *o*-metylidenoquinolilnochinon **59** został wytworzony bez użycia katalizatora czy też promieniowania UV. Autorzy pracy zbadali stabilność tioeteru winylowego w warunkach fizjologicznych, między innymi w obecności utleniaczy jak także reaktywnych aminokwasów takich jak cysteina, lizyna [20].

W obecnym czasie w wielu laboratoriach poszukuje się nowych „narzędzi bioortogonalnych” spełniających wszystkie warunki bioortogonalności.



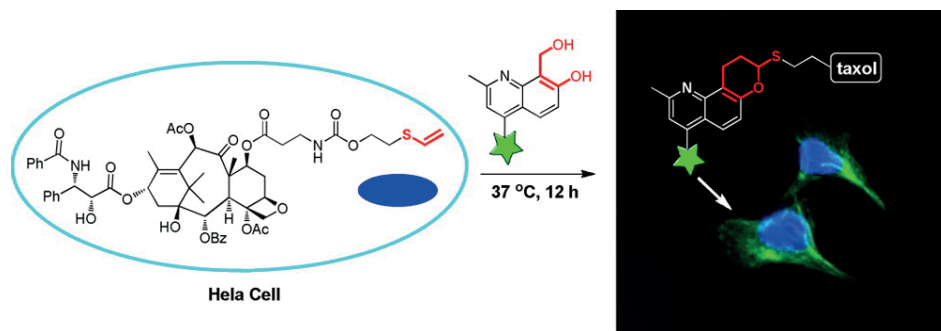
Schemat 11. Reakcja hetero-Diels-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym jako potencjalna reakcja bioortogonalna

Scheme 11. Inverse-Electron-Demand Hetero-Diels–Alder reaction as potential bioorthogonal reaction

Na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego prowadzone są badania mające prowadzić do znalezienia kolejnych bioortogonalnych cykloaddycji 1-oksa-1,3-butadienów i eterów winylowych. Spośród różnych badanych dotychczas reakcji wybrano cykloaddycje 5-arylidenopochodnych kwasów barbiturowych **62** i eterów winylowych **63** (Schemat 11). Najpierw reakcje te przeprowadzono w chlorku metylenu jako rozpuszczalniku [21]. Reakcje te zachodziły w krótkim czasie (1-5 godz.) w temperaturze pokojowej i z wysokimi wydajnościami. Prowadziły do otrzymania dwóch diastereoizomerów *cis* **64** i *trans* **65** pirano[2,3-*d*]pirymidyny. W kolejnych badaniach sprawdzono, że reakcje te mogą być prowadzone w wodzie w temperaturze pokojowej [22]. Po wykazaniu, że reakcje spełniają podstawowe warunki bioortogonalności, sprawdzono stabilność heterodienów w warunkach fizjologicznych. W obecnym momencie trwają prace nad przyłączeniem pochodnej fluoresceiny do heterodieniu oraz wytworzeniem wiązania pomiędzy eterem tiowinylowym i badanym obiektem.

3. ZASTOSOWANIE BIOORTOGONALNYCH CYKLOADDYCJI DO OBRAZOWANIA BIOCZĄSTECZEK I LEKÓW

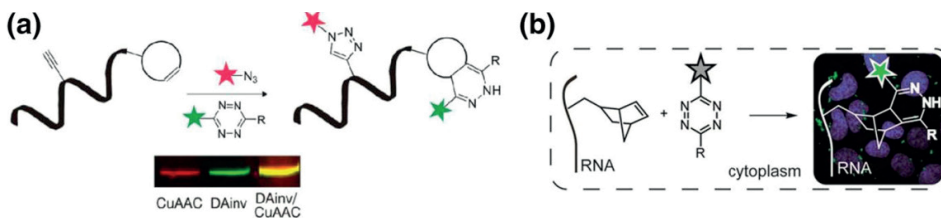
Ciekawym przykładem zastosowania reakcji cykloaddycji 1-oksa-1,3-butadienów i alkenów do bioortogonalnej ligacji jest obrazowanie taxolu znanego w Polsce jako paklitaksel. Taxol jest substancją aktywną znajdującą się w korze cisu krótkolistnego, wykazujący działanie cytotoksyczne w komórkach HeLa. Li i współpracownicy zastosowali reakcję 1-oksabutadienów jako bioortogonalną reakcję, do znakowania białek jak i obrazowania taxolu w żywych komórkach [20]. Na Rysunku 7 przedstawiono obraz jaki otrzymano w mikroskopie konfokalnym świadczący o utworzonej bioortogonalnej ligacji pomiędzy taxolem i fluoresceiną [19].



Rysunek 7. Reakcja 1-oxa-1,3-butadienu w obrazowaniu taxolu w komórkach HeLa. Rysunek zaczerpnięto z *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996 za zgodą American Chemical Society

Figure 7. Cycloaddition of 1-oxa-1,3-butadienes imaging taxol in HeLa cells. Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996. Copyright American Chemical Society

Kwasy nukleinowe są biologicznymi makrocząsteczkami, które odpowiedzialne są za materiał genetyczny, i odgrywają istotną rolę w kodowaniu, przesyłaniu, wyrażaniu i regulowaniu informacji genetycznej. Kilka przykładów modyfikacji kwasu nukleinowego za pomocą reakcji Diels-Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym zostało wykazanych przez grupę Jäschke [23–25]. Na Rysunku 8(a) przedstawiono przykład podwójnej ligacji. Widać jak tetrazyna reaguje z norbornenem, a w tym samym czasie alkin bierze udział w ligacji z fluorogenicznym azydkiem.



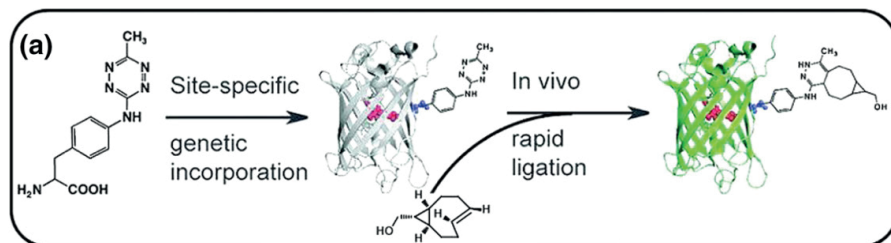
Rysunek 8. a – Modyfikacja DNA poprzez ligację tetrazyny i azydkiem. b – Obrazowanie żywej komórki z syntetycznym RNA za pomocą tetrazyny w fluorogenicznej próbie. Rysunek zaczerpnięto z *Top. Curr. Chem.*, 2016, **3**, 374 za zgodą Springer Nature

Figure 8. a – DNA post-modification by tetrazine and azide ligation. b – Live cell synthetic RNA target image using tetrazine fluorogenic probe. Reprinted with permission from *Top. Curr. Chem.*, 2016, **3**, 374. Copyright Springer Nature

Ostatnio grupa Schorra wytworzyła syntetyczne oligonukleotydy RNA ze znacznikiem norbornenowym, które mogą być znakowane sondą fluorogeniczną tetrazyny (Rys. 8b) w komórkach ssaków przy użyciu tej samej strategii co wcześniej opisana reakcja [24]. Wykorzystanie reakcji z fluorogenicznymi sondami jest potężną techniką obrazowania kwasów nukleinowych.

Ważnym także aspektem zastosowań jest obrazowanie białek za pomocą narzędzi chemii bioortogonalnej. Niedawno opisano jak obrazować w wysokiej

rozdzielczości tkanki odpowiadające za ekspansję genów [27]. Białka w różnych lokalizacjach komórkowych mogą być znakowane przez ligację tetrazyny z fluorogenicznymi znacznikami. Metoda ta służy do obrazowania mikroskopowego z rekonstrukcją optyczną. Badania dostarczają informacji o strukturze białek na powierzchni i wewnątrz badanego układu.



Rysunek 9. Reakcja nie fluoryzującego GFP z pochodną tetrazyny, powodującą fluorescencję GFP Rysunek zaczerpnięto z Top. Curr. Chem., 2016, 3, 374za zgodą Springer Nature

Figure 9. Reaction of inactive GFP with tetrazine derivative causing turn-on GFP. Reprinted with permission from Top. Curr. Chem., 2016, 3, 374. Copyright Springer Nature

UWAGI KOŃCOWE

Chemia bioortogonalna to prężnie rozwijająca się w XXI wieku dziedzina łącząca chemię organiczną z biologią. W niniejszej publikacji starano się ukazać krótką jednak zarazem ciężką drogę chemików organiczków jaką przeszli w poszukiwaniu bioortogonalnych ligacji. Pokazano różne rodzaje reakcji jakie mogą być zastosowane w chemii bioortogonalnej. Zwrócono uwagę na dominującą rolę reakcji cykloaddycji w chemii bioortogonalnej. Szczególnie reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji i reakcje D-A są używane do bioortogonalnej ligacji. Niektóre z omawianych ligacji znalazły zastosowanie do znakowania kwasów nukleinowych, białek, lipidów, glikanów i bioaktywnych małych molekuł leków.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Carell, M. Vrabel, Top. Curr. Chem., 2016, 374, 1.
- [2] R.Y. Tsien, Annu., Rev. Biochem., 1998, 67, 509.
- [3] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Angew. Chem. Int., 2009, 48, 6974.
- [4] W. Russ Algar, P. Dawson, I.L. Mednitz, *Chemoselective and bioorthogonal ligation reactions, concepts and applications*, Wiley-VCH, 2017, 14.
- [5] H. Staudinger, J. Meyer, Helv. Chim. Acta, 1919, 2, 635.
- [6] E. Saxon, C.R. Bertozzi, Science, 2000, 287, 2007.
- [7] R. Huisgen, Angew. Chem., 1963, 13, 604.
- [8] D.M. Patterson, L.A. Nazarova, J.A. Prescher, Chem. Biol., 2014, 9, 592.
- [9] V.V. Rostovtsev, G.L. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 2596.

- [10] R. Huisgen, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 403.
- [11] W.C. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057.
- [12] J. Dommerholt, F.P.J.T. Rutjes, F.L. van Delft, *Top. Curr. Chem.*, 2016, **16**, 374.
- [13] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 14.
- [14] J. McMurry, *Chemia organiczna*, T. 3, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, str. 515.
- [15] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Chemia organiczna*, T. 3, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2010, str. 137.
- [16] D.S. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7816.
- [17] N.K. Devaraj, R. Weissleder, S.A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 2297.
- [18] M.L. Blackman, M. Royzen, J.M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518.
- [19] R. Rossin, S.M. van den Bosch, W. Ten Hoeve, M. Carvelli, R.M. Versteegen, *Bioconj. Chem.*, 2013, **24**, 1210.
- [20] Q. Li, T. Dong, X. Liu, X. Lei, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 4996.
- [21] A. Pałasz, *Monatsh. Chem.*, 2008, **139**, 1397.
- [22] A. Pałasz, *Synthesis*, 2010, **23**, 4021.
- [23] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8846.
- [24] J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconj. Chem.* 2012, **23**, 1382.
- [25] J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12536.
- [26] A. M. Pyka, C. Domnick, F. Braun, *Bioconj. Chem.*, 2014, **25**, 1438.
- [27] C. Uttamapinant, J. D. Howe, K. Lang, V. Beránek, L. Davis, M. Mahesh, N. P. Barry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 4602.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 sierpnia 2018