

---

# Биоортогональные реакции: типы и применение

Бубырев А.И., Рубичева Л.Г., Хазанова М.А.

## Стратегия биоортогональных реакций

Этап 1: введение биоортогональной группы в биомолекулу



Этап 2: биоортогональная реакция – присоединение метки



2

[1] T. Carell, M. Vrabel, *Top. Curr. Chem.* 374(1): 9, 5–25 (2016), IF=6.721

Биоортогональными называются химические реакции, способные происходить внутри клеток или живых организмов, не затрагивая естественные биохимические процессы в них.

Стратегия биоортогональных реакций состоит во введении в биомолекулу таких функциональных групп, которые не встречаются в природных соединениях, и последующем присоединении необходимого фрагмента (например, метки), содержащего комплементарную функциональную группу, путём селективной реакции между ними.

## Требования к биоортогональным функциональным группам



3

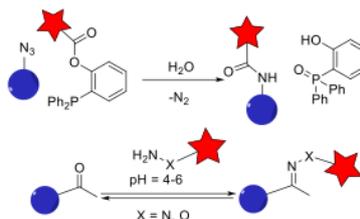
[2] Y. Tian, Q. Lin, *ACS Chem. Biol.* 14, 12, 2489–2496 (2019), IF=4.374

К биоортогональным реакциям предъявляются следующие требования: (1) высокая скорость реакции; (2) селективность – реакция должна протекать селективно между используемыми функциональными группами без побочных процессов с участием других биомолекул; (3) способность протекать в физиологических условиях (водная среда, определённый pH и температура); (4) нетоксичность реакции. Кроме того, введение ортогональной функциональной группы не должно влиять на биологическую активность модифицируемой молекулы [1, 2].

## Типы биоортогональных реакций

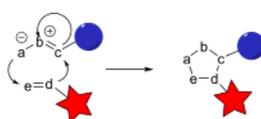
### Полярные реакции

- лигирование по Штаудингеру
- конденсации альдегидов и кетонов



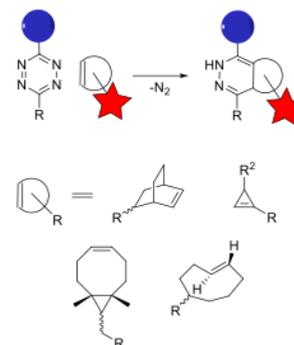
**Биоортогональные реакции**

1,3-дипольное циклоприсоединение



### Реакции Дильса-Альдера

- реакции 1,2,4,5-тетразина с напряжёнными олефиновыми циклами

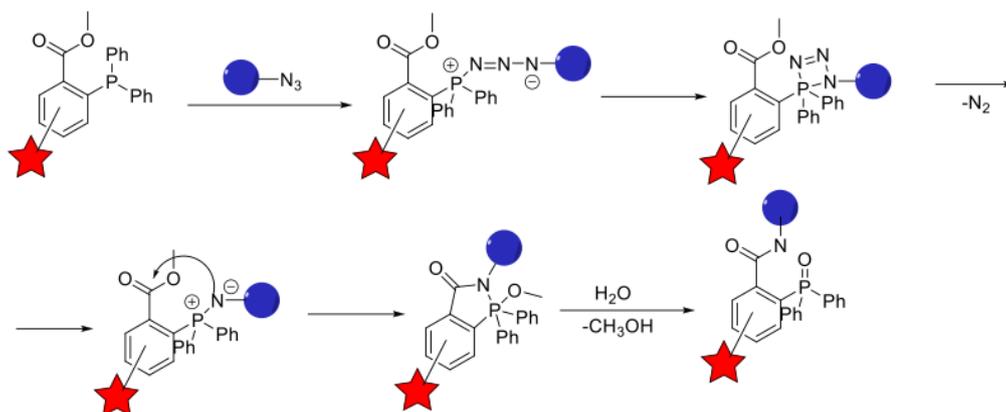


4

Можно выделить три типа биоортогональных реакций: полярные реакции, к которым относится лигирование по Штаудингеру и различные реакции конденсации карбонильных соединений, реакции 1,3-дипольного циклоприсоединения и реакции Дильса-Альдера. Наиболее часто применяемыми в качестве биоортогональных реакций являются реакции 1,3-дипольного циклоприсоединения, а также реакции Дильса-Альдера. Это объясняется высокой хемоселективностью этих превращений, а также тем, что участвующие в них функциональные группы не встречаются в биомолекулах; кроме того, эти реакции могут протекать в водной среде.

## Полярные реакции – лигирование по Штаудингеру

Общая схема реакции лигирования по Штаудингеру:



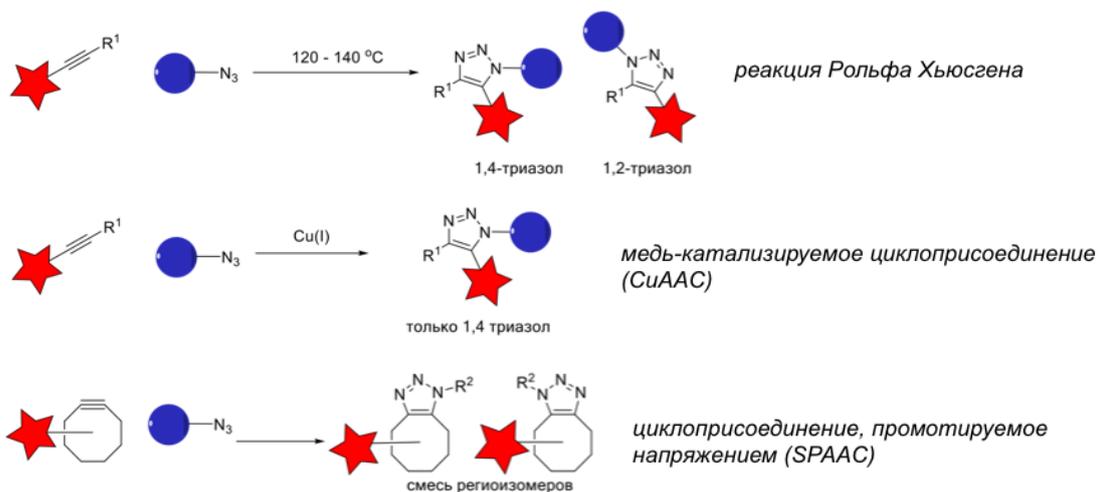
5

[3] D. Patterson et al., *ACS Chem. Biol.* 9, 3, 592–605 (2014), IF= 4.374

Одним из первых примеров биоортогональной реакции является лигирование по Штаудингеру, представляющее собой модификацию реакции Штаудингера между азидами и арилфосфинами. Азидная группа, внедряемая в биомолекулу и являющаяся мягким электрофилом, инертна по отношению к функциональным группам в составе биомолекул, которые, как правило, являются жесткими нуклеофилами. В результате реакции азида и фосфина образуется прочная амидная связь между фрагментом биомолекулы и введённой меткой. В настоящее время эта реакция почти не используется ввиду своей невысокой скорости [3].

## 1,3-диполярное циклоприсоединение

Азид-алкиновое циклоприсоединение в различных вариациях:



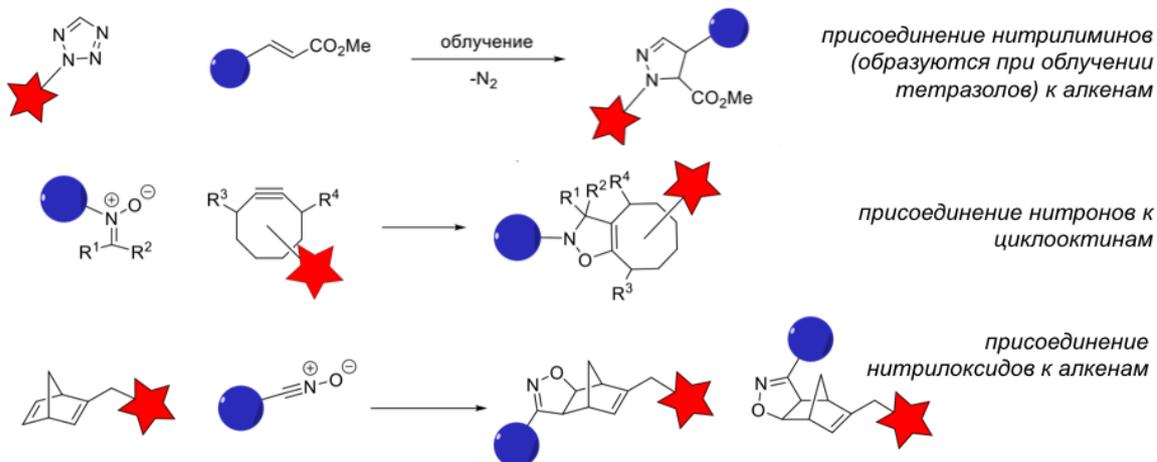
6

[1] [3]

Реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения успешно используются для биоконъюгирования с участием различных диполей. Одной из самых распространённых реакций этого типа является реакция азид-алкинового циклоприсоединения. Открытая в конце 19 века Артуром Михаэлем и впоследствии активно изучавшаяся Рольфом Хьюсгеном, она в первоначальном своём варианте не могла быть применена в качестве биоортогональной. Циклоприсоединение шло при высокой температуре (120–150 градусов Цельсия) за достаточно долгий временной промежуток (5–8 часов). Однако в 2002 году двумя независимыми группами химиков было открыто, что азид-алкиновое циклоприсоединение может легко протекать в мягких условиях (в том числе и в воде) при катализе одновалентной медью. Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I), удобна для мечения биомолекул ввиду высокой скорости реакции. Однако использование медного катализатора в живых организмах невозможно из-за его токсичности. Чтобы обойти эту проблему, применяют безмедный вариант реакции азид-алкинового циклоприсоединения, где в качестве диполярофила используется напряжённый алкиновый цикл, и реакция протекает ввиду снятия углового напряжения в цикле в результате взаимодействия [1].

## 1,3-диполярное циклоприсоединение

Другие реакции [3+2]-циклоприсоединения:



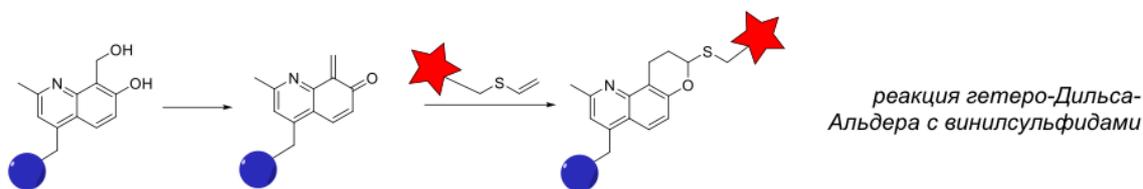
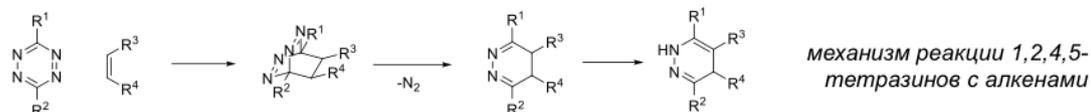
7

[1]

Кроме азидов в качестве диполей в реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения также используются нитроны, нитрилоксиды и нитрилимины. Так, реакционноспособные нитрилимины могут быть получены в основной среде из соответствующих тетразолов при достаточно мягком облучении (302 нм). Большим преимуществом использования нитрилиминов является образование флуоресцентных пиразолиновых производных. Таким образом, для визуализации биомолекулы нет необходимости в отдельном синтезе присоединяемых флуорофорных фрагментов, кроме того, благодаря такому подходу при визуализации нет фонового шума от оставшихся в среде флуорофоров [1].

## Реакции Дильса-Альдера

Реакции Дильса-Альдера, используемые как биоортогональные:



8

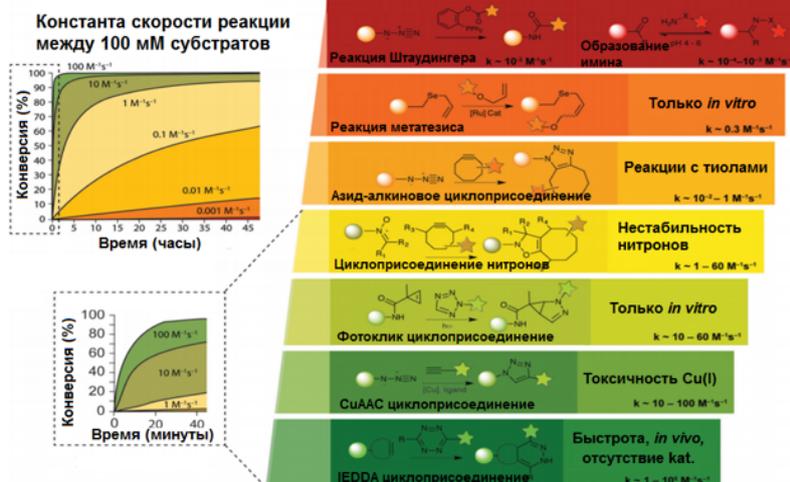
[1]

Реакции Дильса-Альдера также широко применимы в качестве биоортогональных реакций. Как известно, реакции Дильса-Альдера реализуются в двух вариантах: с нормальной и обращённой полярностью. Проблема реакций Дильса-Альдера с нормальной полярностью заключается в их обратимости, поэтому в качестве биоортогональных реакций чаще применяют вариант с обращённой полярностью.

Среди реакций Дильса-Альдера с обращённой полярностью наиболее применимыми являются реакции между электронодефицитными 1,2,4,5-тетразинами и напряжёнными олефиновыми циклами, такими как норборнен и *транс*-циклооктен. Кроме них возможно использование других диенофилов: циклооктинов, циклопропенов и *N*-ацетилазетининов. Ввиду выделения азота в ходе реакции такие превращения являются необратимыми. 1,2,4,5-тетразины нестабильны в физиологических условиях, кроме того, их синтез достаточно трудоёмок, ввиду чего было предложено использовать другие азидаины. Например, моноарил-1,2,4-триазины реагируют с напряжёнными *транс*-циклооктенами, однако они не вступают в реакцию с другими напряжёнными олефинами, такими как норборнен и циклопропен. Известна также реакция гетеро-Дильса-Альдера с винилсульфидами, в которой *in situ* образуется экзометиленовый 1,4-непредельный кетон, однако широкого распространения она не получила [1].

## Кинетика биоортогональных реакций

Сравнение кинетики различных типов биоортогональных реакций:



9

[4] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* 46, 4895-4950 (2017), IF=49.443

Как уже было сказано, к биоортогональным реакциям предъявляется большое количество требований, одним из которых является высокая скорость реакции. Важность необходимости высокой реакционной способности объясняется условиями, в которых проводится большинство биоортогональных реакций. Обычно эти реакции протекают в условиях очень высокого разбавления (менее 1 мг/мл). Биоортогональные реакции – это реакции второго порядка, кинетическое уравнение реакции имеет следующий вид:

$$V = K_2 C_A^2$$

Чем выше константа, тем более эффективна реакция конъюгации при низких значениях концентрации реагентов, в разумных временных масштабах, при значениях pH, близких к нейтральным, и без необходимости использования большого избытка одного из реагентов.

В зависимости от скорости, биоортогональные реакции могут быть условно разделены на несколько групп:

$K = 10^2 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (реакция Дильса-Альдера с обращёнными электронными требованиями)

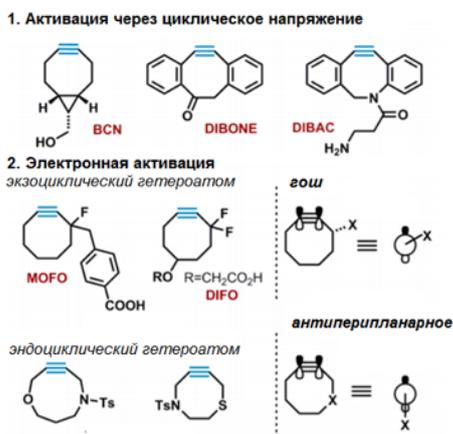
$K = 10 - 60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (медь-катализируемая реакция азид-алкинового циклоприсоединения)

$K = 0.1 - 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (циклоприсоединение нитронов и алкинов, промотированное напряжением)

$k = 10^{-4} - 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (реакция Штаудингера)

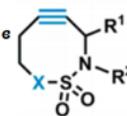
Как видно, лигирование по Штаудингеру характеризуется очень низкой скоростью реакции, поэтому в настоящее время оно практически не находит применения в *in vivo* исследованиях. Таким образом, поиск новых более быстрых реакций, а также дизайн более реакционноспособных субстратов для уже известных реакций является актуальной задачей [4].

Варианты активации циклооктинового фрагмента

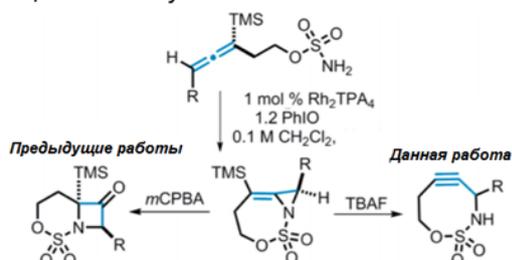


Дважды активированный циклооктин

Циклооктин, содержащий гетероатом в пропаргильном и гомопротаргильном положении



Синтетический подход к сульфаматному циклооктину



10

[5] R. Ni et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1190–1194 (2015), IF=12.257

Так, большое количество исследований посвящено синтезу новых напряжённых циклооктиновых структур для использования в реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Типичной стратегией для повышения напряжённости цикла является включение в кольцо  $sp^2$ -гибридизованного атома. Хотя такие модификации и приводят к увеличению скорости реакций по сравнению с неактивированными циклооктинами, также возрастает и реакционная способность данных структур и к другим функциональным группам помимо азидов. Такая несовместимость с определёнными условиями реакций сильно ограничивает потенциальные возможности применения этих циклоалкинов в биологических системах.

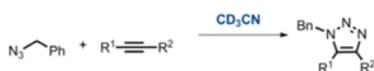
В противоположность активации путём увеличения напряжённости цикла, электронная активация также даёт большой прирост в скорости реакции с азидом, при этом эффективно уменьшая напряжённость цикла и тем самым минимизируя нежелательные побочные превращения. Увеличение скорости реакции в случае электронной активации объясняется уменьшением энергии переходного состояния реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Так были синтезированы фторированные циклооктины (монофторированный MOFO и дифторированный DIFO); введение электроноакцепторного атома фтора в пропаргильное положение смогло значительно увеличить скорость реакции циклоприсоединения. Выбор фтора в качестве электроноакцепторной группы объяснялся рядом причин. Так, фтор обладает очень малым ван-дер-ваальсовым радиусом (сравнимым с радиусом водорода), что не создаёт стерических затруднений при подходе азидного фрагмента биомолекулы. Также введение фтора не превращает циклооктин в акцептор Михаэля, что исключает побочные реакции, например, с тиольными группами аминокислот. Дальнейшие исследования показали, что введение гетероатома в кольцо циклооктина, а точнее в его эндоциклическое пропаргильное положение, способно сильно увеличить скорость реакции циклоприсоединения. В другой работе с использованием квантово-химических расчётов был также продемонстрирован положительный эффект введения гетероатома в гомопротаргильное положение [5].

Следуя такой логике электроноакцепторной активации, американские исследователи синтезировали циклооктины, содержащие одновременно пропаргильные и гомопротаргильные гетероатомы, разделённые сульфонильной группой. Стереозлектронный кооперативный эффект обоих гетероатомов позволил получить циклооктин, обладающий превосходным балансом стабильности по отношению к побочным превращениям и высокой реакционной способностью по отношению к азидной функции.

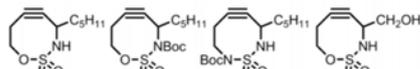
Сохраняющейся проблемой является труднодоступность некоторых из циклоалкинов. Методы их синтеза обычно времязатратны и малоэффективны, что объясняется сложностью в преодолении энтропийного фактора при образовании напряжённых циклов. В данной работе был разработан эффективный способ синтеза сульфонициклооктинов исходя из силилированных алленов. Ключевыми стадиями являются родий-катализируемая реакция образования азиридина и расширения цикла.

## Новые примеры реакций

### Сравнение кинетики циклоприсоединения



#### Циклооктины содержащие сульфаматную группу



$$k_2 = 0.025 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

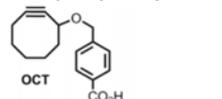
$$0.023$$

$$0.0014$$

$$0.087$$

#### Сравнение с другими циклооктинами

##### Активация через напряжение



$$k_2 = 0.0024 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

##### Электронная активация



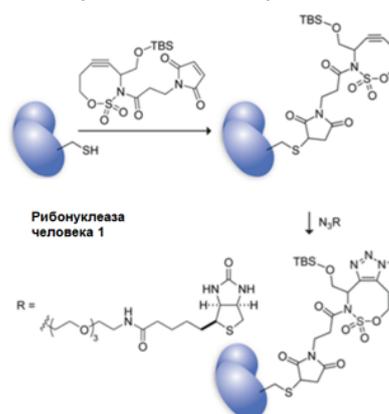
$$0.0043$$

$$0.076$$

$$0.0085$$

$$0.019$$

### Применение сульфаматного циклооктина в реакции конъюгирования



Модельная реакция [3+2]-циклоприсоединения сульфаматного циклооктина с бензилазидом показала высокие кинетические характеристики, значительно превосходящие таковые для ранее полученных циклооктинов.

Эффективность данного метода была опробована на модельной реакции лигирования белка человеческой рибонуклеазы 1 (масса 17,644 кДа) с биотином, связанным с азидной группой полиэтиленгликолевый линкером. Образование конъюгированного продукта было зарегистрировано масс-спектрометрическим методом [6].

Применение биоортогональных реакций		
<p><i>Мечение биомолекул для флуоресцентной визуализации</i></p> <p><b>Проблема:</b> метки на основе зелёного флуоресцентного белка применимы только для протеинов</p> <p>✓ биоортогональные реакции позволяют вносить метки в другие биомолекулы: гликаны, нуклеиновые кислоты etc.</p>	<p><i>В системах адресной доставки лекарств</i></p> <p><b>Проблема:</b> линкеры, используемые доставки лекарств, могут быть нестабильными в кровотоке → преждевременное высвобождение лекарственного средства</p> <p>✓ биоортогональные реакции позволяют высвобождать лекарственный препарат контролируемо</p>	<p><i>Внесение радиоизотопных меток</i></p> <p><b>Проблема:</b> многие диагностические радиоизотопы (<math>^{11}\text{C}</math>, <math>^{18}\text{F}</math>, <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math> и <math>^{66}\text{Ga}</math>) имеют короткие периоды полураспада</p> <p>✓ биоортогональные реакции проходят за короткое время, позволяя получать и использовать меченые радиоизотопами молекулы</p>
12		[1] [7] [8]

Одни из важнейших приложений биоортогональной химии – мечение биомолекул для флуоресцентной визуализации, направленная доставка и активация пролекарств и мечение биомолекул радиоизотопами.

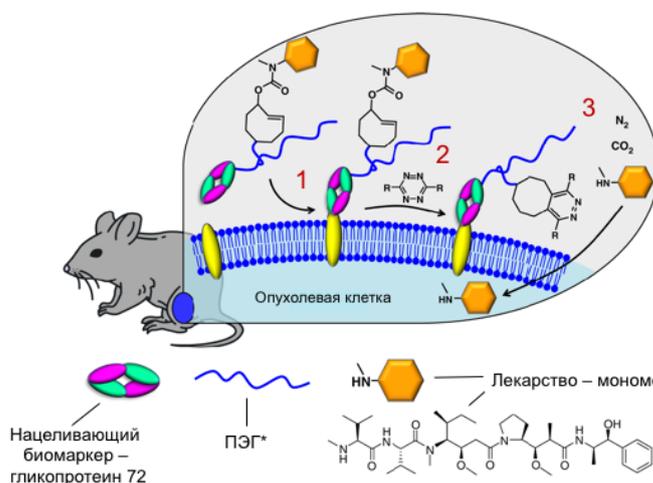
Понимание биологических процессов напрямую зависит от возможности визуализировать ключевые биомолекулы. Разработка генетически кодируемых флуоресцентных белков произвела революцию в отслеживании и обнаружении нативных белков в живых системах. Однако для других биомолекул, таких как липиды, гликаны и нуклеиновые кислоты, такой подход внесения флуоресцентных меток неосуществим. Биоортогональные реакции стали решением этой проблемы, поскольку они позволяют вносить метки в любые биомолекулы [1].

Направленная доставка химиотерапевтических препаратов в эффективных концентрациях в определенные места опухоли является выигрышной, но сложной в исполнении стратегией. Для достижения сайт-специфической активации пролекарств системы доставки лекарств ориентируются на внутриклеточные параметры (pH, окислительно-восстановительный потенциал) или сверхэкспрессированные ферменты (например, эстеразы и протеазы), которые существуют в микроокружении опухоли. Однако некоторые расщепляемые линкеры, используемые для этой стратегии, оказываются нестабильными в кровотоке, что может привести к преждевременному высвобождению лекарственного средства, вызывая побочные эффекты. Биоортогональная химия предлагает подходы, способные преодолеть эти проблемы благодаря своей относительно стабильной и контролируемой системе высвобождения лекарств посредством индуцируемых химических реакций [7].

Биоортогональные реакции применяются также для синтеза меченных радиоизотопами молекул. Последние необходимы для ядерной визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, а также для терапевтических применений.

Многие важные диагностические радиоизотопы, включая  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{66}\text{Ga}$  имеют короткие периоды полураспада, и, следовательно, процедуры радиоактивного мечения ими требуют быстрых и эффективных реакций, которые могут обеспечить высокий радиохимический выход и минимальное образование нежелательных побочных продуктов. Биоортогональные реакции без катализатора являются полезными инструментами для радиоактивного мечения сложных малых молекул и биомакромолекул, которые чувствительны к условиям реакции, таким как повышенные температуры, экстремальные значения pH и присутствие металлических катализаторов.

## Применение биоортогональных реакций



Доставка лекарств с предварительным нацеливанием:

- 1 – доставка препарата к месту опухоли с помощью биомаркера
- 2 – введение триггера – тетразина
- 3 – присоединение тетразина к фрагменту *транс*-циклооктена и высвобождение лекарственного препарата

13

[7] R. Rossin et al., *Nat. Commun.* 9, 1484 (2018), IF=11.880

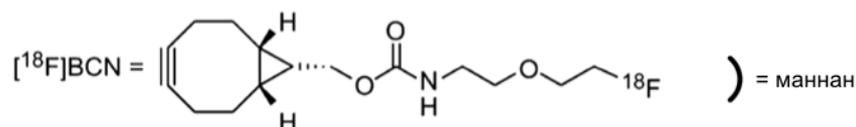
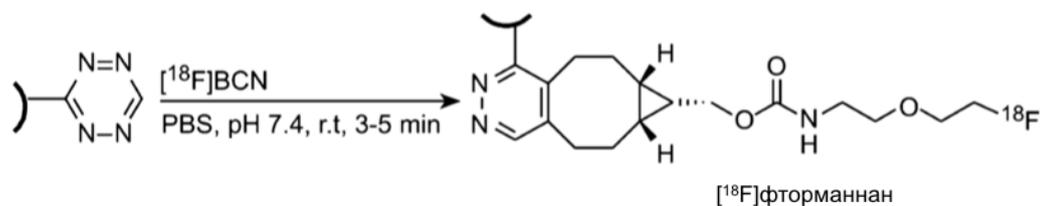
\*ПЭГ – полиэтиленгликоль

Один из подходов, реализуемый с помощью биоортогональных реакций в системах доставки лекарств – доставка с предварительным нацеливанием. В этой системе доставки антитело используется в качестве нацеливающего биомаркера и связывается с пролекарством через химически расщепляемый линкер. При этом сформированный конъюгат антитело-лекарственное средство является стабильным и неактивным в кровотоке. После доставки в целевой опухолевый участок линкер расщепляется контролируемым образом с помощью биоортогональной реакции.

Например, в работе [7] в качестве нацеливающего биомаркера авторы выбрали ассоциированный с опухолью гликопротеин 72, который экспрессируется на поверхности раковых клеток. Этот биомаркер связан с лекарственным средством через фрагмент *транс*-циклооктена. Для расщепления линкера между маркером и лекарством была использована реакция Дильса-Альдера с обращённой полярностью между *транс*-циклооктеном и тетразином. При введении триггера – тетразина – происходит высвобождение активного лекарственного средства.

## Применение биоортогональных реакций

Внесение метки  $^{18}\text{F}$  в полисахарид маннан:



PBS = натрий-фосфатный буфер

Рассмотрим пример использования биоортогональной реакции для введения радиоизотопной метки в биомолекулу. В работе 2016 года исследователи использовали меченный изотопом  $^{18}\text{F}$  полисахарид маннан в качестве зонда для исследования патологических процессов в коже мышей. Ранее ими было выяснено, что данный полисахарид вызывает псориаз и псориатический артрит у мышей. Маннан с радиоактивной меткой вводили мышам и наблюдали за его распределением в тканях животного с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Для введения метки  $^{18}\text{F}$  в полисахарид использовали реакцию Дильса-Альдера с участием  $^{18}\text{F}$ -меченого бицикло[6.1.0]нонина и тетразинового фрагмента [8].

- Биоортогональная химия применяется для введения различных меток в биологических и медицинских исследованиях
- Биоортогональные реакции – удобный инструмент для проведения контролируемых химических реакций в клетках и живых организмах
- Биоортогональная химия является перспективным инструментом для молекулярной визуализации *in vivo*, а также в системах направленной доставки лекарств
- Биоортогональные реакции продолжают совершенствоваться по различным параметрам, что может расширить области их применения

Таким образом, мы видим, что уже сегодня биоортогональная химия является потрясающим по своему функционалу инструментом – она позволяет ученым проводить контролируемые химические реакции *in situ* в живых клетках и организмах. С момента своего появления биоортогональные реакции постоянно совершенствуются. Новые реакции открывают новые возможности и области применения, в частности, благодаря оптимизации кинетики, стабильности и размеров реакционных партнеров. Вероятно, вектором исследований пока будет оставаться совершенствование молекулярной визуализации *in vivo* и, безусловно, использование биоортогональных связей для инициирования образования биологически активных компонентов, будь то прямой синтез лекарств *in situ* или же инициированное высвобождение активного вещества.

## Список литературы

1. T. Carell, M. Vrabel, *Top. Curr. Chem.* 374(1): 9, 5–25 (2016), IF=6.721
2. Y. Tian, Q. Lin, *ACS Chem. Biol.* 14, 12, 2489–2496 (2019), IF=4.374
3. D. Patterson et al., *ACS Chem. Biol.* 9, 3, 592–605 (2014), IF= 4.374
4. B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* 46, 4895-4950 (2017), IF=49.443
5. R. Ni et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1190–1194 (2015), IF=12.257
6. E. G. Burke et al., *J. Am. Chem. Soc.* 139, 23, 8029–8037 (2017), IF=14.695
7. R. Rossin et al., *Nat. Commun.* 9, 1484 (2018), IF=11.880
8. X. Li et al., *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 9, 826–830 (2016), IF=3.746