

Klik kimika: erabilera askotariko Nobel saridun erreakzioa

Click chemistry: Nobel Prize reaction with multiple uses

Maria Diaz-Galbarriatu¹, Julia Sánchez-Bodón¹, Isabel Moreno-Benítez^{2*}, José Luis Vilas-Vilela^{1,3}

¹ Kimika Makromolekularra Ikerketa taldea (LABQUIMAC), Kimika Fisikoa Saila (UPV/EHU)

² Kimika Makromolekularra Ikerketa taldea (LABQUIMAC), Kimika Organikoa eta Ez-organikoa Saila (UPV/EHU)


³ BCMaterials, Basque Centre for Materials, Applications and Nanostructures

LABURPENA: 2022ko Kimikako Nobel saria Carolyn R. Bertozzik, Morten Meldalek eta Karl B. Sharplessek jaso zuten, konposatu desberdinak modu azkar eta eraginkorren egiteko prozedura berria garatu zutelako, klik kimika deritzona. Klik erreakzioek hainbat abantaila aurkezten dituzte, adibidez esperimenteraz errazak dira, erreakzio baldintza anitz tolerantza dituzte, oso selektiboak eta erregioespezifikoak dira eta etekin kuantitatiboak ematen dituzte. Gainera, ez dira oxigenoarekiko eta urarekiko sentikorrek eta isolatze etapa erraza duten erreakzioak dira. Horretaz gain, klik erreakzioak lau talde nagusitan bana daitezke: ordezkapen nukleozalea, zikloadizioak, karboniloen erreakzio ez-aldolikoak eta C-C lotura anizkoitzen gaineko adizio erreakzioak. Aipatutako baldintzak betetzen dituzten erreakzioen artean, kobrez katalizaturiko azida eta alkino 1,3-zikloadizioa klik erreakzio ezagunena da. Izan ere, oso erabilia izan da hainbat eremutan, hala nola, materialen kimikan, biokimikan edo kimika medikoan. Esate baterako, aktibitate biologikoa dituzten molekulak gainazal metaliko edo polimerikoen gainean biokonjugatzeko, farmako berriak garatzeko, propietate hobeak dituzten material termoeonkorrak garatzeko eta katalizatzaile gisa erabili daitezkeen hidrogelak eratzeko erabili izan ohi da. Gainera, Bertozzik klik kimika aurrerago eraman zuen, sistema biologikoetan erabili ahal den kobrerik gabeko klik erreakzioa garatu zuen, kimika bio-ortogonal sortuz. Horretarako, zitotoxikoa den kobre katalizatzailea baztertu zuen alkinoen erreaktibitatea areagotzen duen prozeduran oinarrituz. Are gehiago, erreakzio hau biomolekulen eta minbizi zelulen markatze kobalenterako erabili izan da zelula biziak erabiliz; baita minbiziaren kontrako farmakoak daramatzen nanopartikulak tumorea selektiboki metatzeko estrategia bezala ere.

HITZ GAKOAK: Nobel saria, klik, bio-ortogonal.

ABSTRACT: The 2022 Nobel Prize in Chemistry was awarded to Carolyn R. Bertozzi, Morten Meldal and Karl B. Sharpless for the development of a novel procedure enabling effective and quickly synthesis of diverse compounds, known as Click Chemistry. Click reactions offer numerous advantages, for example, they are experimentally easy, they tolerate a wide range of reaction conditions as well as oxygen and water, they exhibit high selectivity and regioselectivity, provide quantitative yields and they involve easy purification processes. Moreover, click reactions can be categorized into four primary groups: nucleophilic ring opening reactions, cycloadditions, carbonyl no aldolic reactions and addition reactions on C-C multiple bonds. Among click reactions, the copper catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction stands out as the most known click reaction. Indeed, it has found extensive application in diverse fields including material chemistry, biochemistry and medicinal chemistry. For instance, it is frequently employed in bioconjugation reactions, binding covalently biologically active molecules onto metallic or polymeric surfaces. Furthermore, this reaction plays a crucial role in the synthesis of drugs, or in the development of improved thermostable materials as well as or in the crosslinking of hydrogels that can be used as catalyst. Moreover, Bertozzi expanded the realm of click chemistry by pioneering the copper-free click reaction, in biology media, thereby developing bio-orthogonal chemistry. This new procedure avoids the use of copper catalyst and its inherent cytotoxicity, by improving the reactivity of the alkynes reagents. This innovation has facilitated the covalent binding of

1

***Harremanetan jartzeko/ Corresponding author:** Isabel Moreno-Benítez, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Kimika Organikoa eta ez-organikoa Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa.  <https://orcid.org/0000-0001-8714-9120>, mariaisabel.moreno@ehu.eus

Nola aipatu / How to cite: Díaz-Galbarriatu, María; 2 Sánchez-Bodón, Julia; Moreno-Benítez, Isabel; Vilas-Vilela, José Luis (2024). <<Klik kimika: erabilera askotariko Nobel saridun erreakzioa>>, Ekaia, 46, xx-xx. (https://doi.org/10.1387/ekaia.25485)

Jasoa: azaroak 22, 2023; Onartua: otsailak 12, 2024

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2024 UPV/EHU



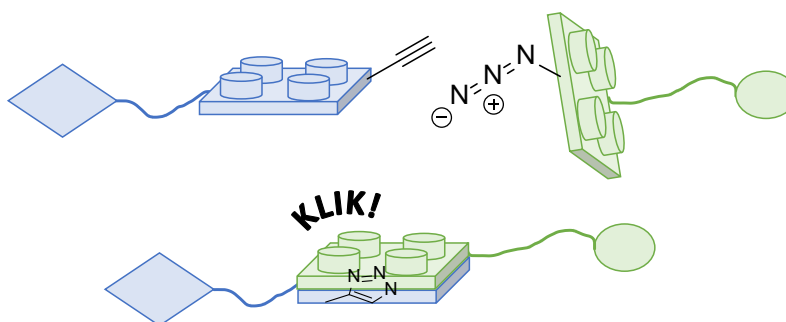
Obra Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

biomolecules and live cancer cells. Additionally, this copper-free click reaction has been strategically employed to selectively carrying nanoparticles with anticancer drugs into cancerous tissues.

KEYWORDS: Nobel prize, click, bio-orthogonal.

1. SARRERA

Pasa den urteko, 2022ko, Kimikako Nobel saria Carolyn R. Bertozzik, Morten Meldalek eta Karl. B. Sharplessek jaso zutela adierazi zuen Suediako Akademiak[1]. Izan ere, Morten Meldal kimikari danimarkarra eta Barry Sharpless kimikari estatubatuarra nabarmendu zituen, molekulen arteko lotura kobalenteak egiteko modu berria garatu zutelako, “klik kimika” izenekoa[2]. Kimika honen bidez, konposatu berriak azkar eta modu eraginkorrean sortzen diren molekula txikiagoen konbinazioetatik abiatuta, lego baten piezak balira bezala (**1. irudia**). Hirugarren saritua, Stanfordeko Unibertsitateko Carolyn Bertozzi kimikari estatubatuarra, haratago joan zen, eta kimika hau dimentsio berri batera eramane zuten, zelula bizien barnera, hain zuzen ere[3].



1. irudia. Morten Meldal eta Barry Sharpless zientzialarien ideia klik kimikari buruz.

2022ko Kimikako Nobel saria aipatzekoa da hainbat berezitasunengatik. Lehenik eta behin, Sharplessentzat bigarren Nobel saria da. Izan ere, ikertzaile honek 2001ean ere jaso zuen prestigio handiko sari hau, oxidazio kiral katalizatuetan egindako aurrerapenengatik[4–6]. Sharpless bi aldiz saritutako laugarren pertsona da, M. Curieren (Fisika 1903, Kimika, 1911)[7], L. Paulingen (Kimika 1954 eta Bakea 1962)[8] eta F. Sangerren (Kimika 1958 eta Kimika 1980)[9] ondoren. Bestalde, Bertozzi sari hau jasotzen duen zortzigarren emakume ikertzailea da. 1901az geroztik, 189 kimikako Nobel sari banatu dira, eta 8 bakarrik izan dira emakumeentzat, hau da, soilik % 4[10]. Hala ere, 2023an, 4 emakumeek Nobel saria jaso dute zientzia eremu ezberdinetan egindako ekarpenengatik. Horietako bat Anne L’Huillier fisikari frantsesa izan da, argi infragorria gas geldo batetik pasatzerakoan argi ñabardura ezberdinak eratzen direla deskubritu baitu. Horrez gain, Katalin Karikók biokimikari hungariarra ere nabarmentzen da COVID-19ren aurkako mRNA-ren txerto eraginkorrak garatzea ahalbidetu duten base nukleosidoen aldaketei buruzko aurkikuntzenengatik[11]. Aurten ere, Claudia Goldin ekonomista eta akademika estatubatuarra Nobela irabazi du ekonomia arloan, lan merkatuan aurkitzen diren genero diferentziak aurkezteagatik[12], eta Narges Mohammadi, Irango giza eskubideen aldeko ekintzaile honek, Bakezko Nobel saria jaso izan du[13].

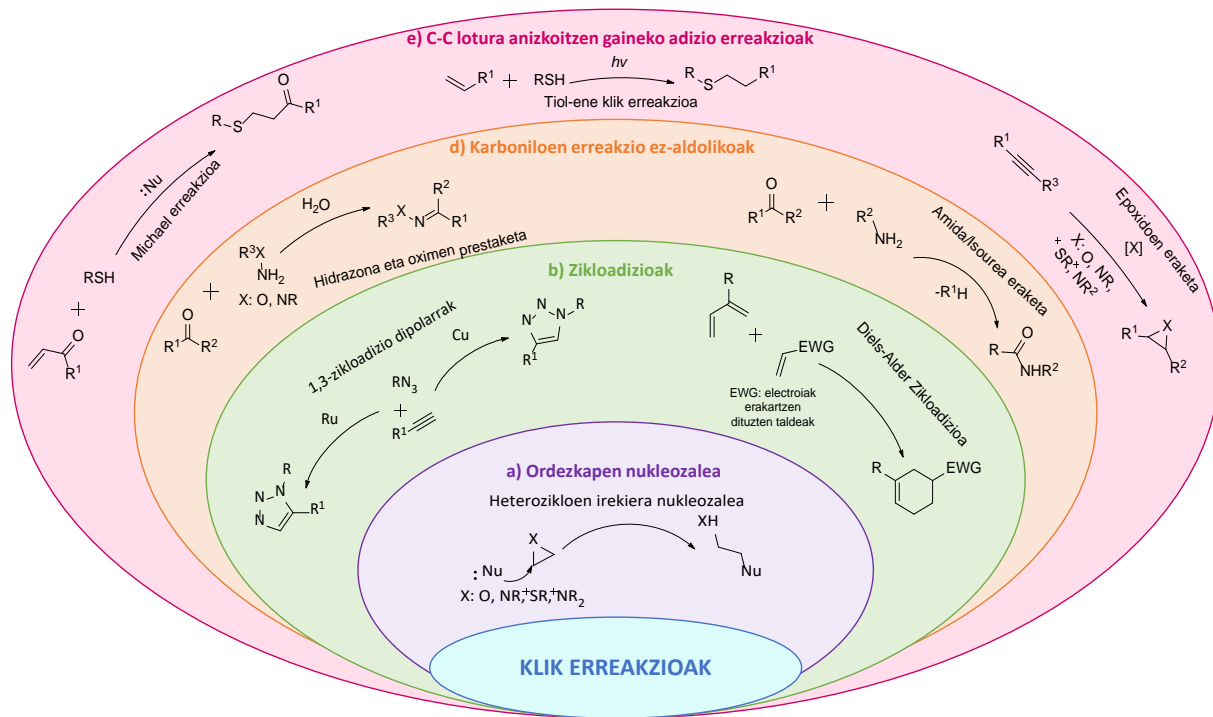
Artikulu honetan, iazko Kimikako Nobel saria jaso zuten hiru ikertzaile bikain horien ekarpenak deskribatu nahi ditugu, ekarpen horiei esker sari zientifiko ospetsuenetariko bat lortu baitute. Ordena kronologikoari jarraituz, klik kimika sortu zenetik, gaur egungo eremu desberdinetan, hala nola materialen kimikan[14], biokimikan eta kimika medikoan[15], dituen aplikazio berrienetarainoko bidea azalduko da.

2. KLIK KIMIKAREN JAIOTZA. LEHENENGO URRATSAK

Oro har, erreakzio bat klik motakotzat hartu ahal izateko ezaugarri hauek bete behar ditu[16]:

- ikuspuntu esperimental batetik erraza izatea, eskuragarriak diren errektiboetatik abiatuz[17];
- talde funtzional ugarien aurrean tolerantzia izatea[18];
- oso selektiboa[18] eta erregioespezifikoa izatea[19];
- produktua etekin kuantitatiboekin lortzea[14,17];
- oxigenoarekiko edo urarekiko sentikorra ez izatea[14];
- azken produktua isolatzeko etapa erraza izatea, purifikazio kromatografikorik gabe[17,18].

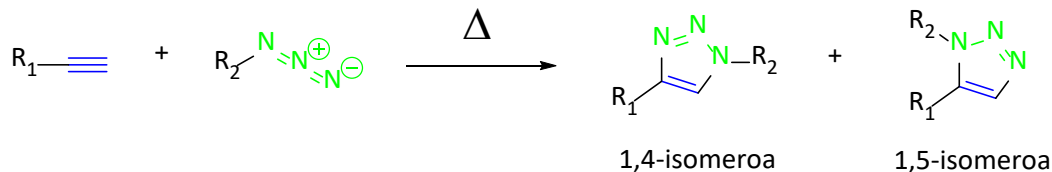
Sharplessek lau talde nagusitan sailkatu zituen klik erreakzioak (**2. irudia**)[5]. Alde batetik, ordezkapen nukleozaleak daude. Lehenengo talde honen adibidea, hiru aldeetako heterozikloen irekiera nukleozalea da, epoxidoena edo aziridinena besteak beste[20]. Bigarren taldean, karboniloen erreakzio ez-aldolikoak daude, adibidez oxima edo hidrazonen prestaketa[21]. C-C lotura anizkoitzen gaineko adizio erreakzioak beste talde batean daude Sharplesen sailkapenean. Talde honetan adibide asko dauzkagu, hala nola 1,4-adizio konjugatuak, aziridina edo epoxidoen sintesia alkenoetatik hasita[22] edo tiol-ene[23] eta tiol-ine klik erreakzioak. Zikloadizioekin amaitzen da Sharplesen sailkapena, talde honen adibide aipagarrienak Diels-Alder erreakzioa[24] eta 1,3-adizio dipolarra izanik[25].



2. irudia. Sharplesen klik erreakzioen sailkapena.

Aipatutako baldintzak betetzen dituzten erreakzio guztien artean, azida eta alkinoen arteko 1,3-zikloadizio dipolarra klik erreakzio moduan sailkatutakoen barruan prototipo gisa ezarri da. Erreakzio hau, Huisgenek 1960an lehen aldiz deskribatu zuen eta 1,2,3-triazolak sintetizatze biderik eraginkorra da. Hala ere, prozesu horrek temperatura altuak eta erreakzio-denbora luzeak eskatzen

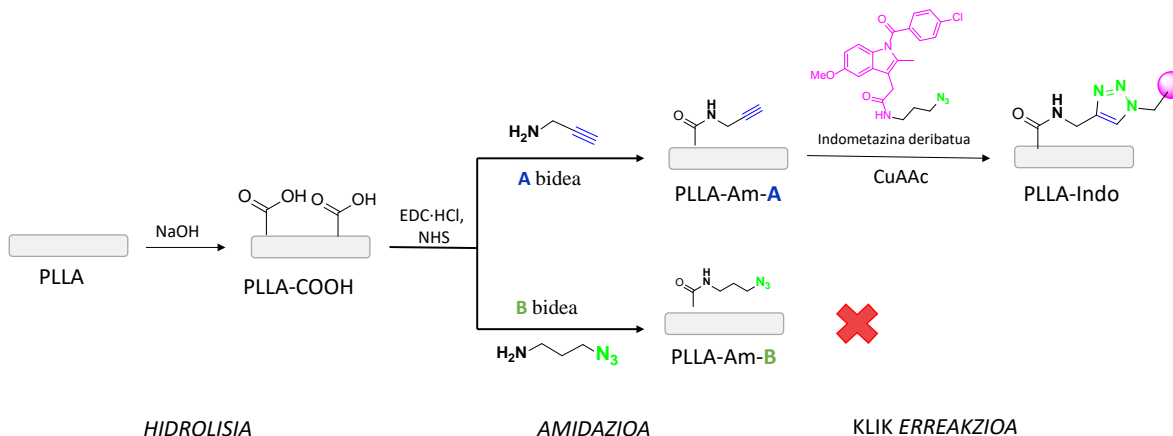
ditu. Baldintza termiko horietan erreakzioak ez du erregioselektibitate aurkeztu, izan ere, bi erregioisomero posibleak (1,4 eta 1,5 isomeroak) eratzen dira (**1. eskema**), proportzio ekimolarrean, hau da, [26].



1. eskema. Azida eta alkinoaren arteko Huisgenen erreakzioa

Erreakzio horren eragin nabarmena ez zen iritsi iazko Kimikako Nobel sarituetako bik ekarpen bana egin zuten arte. Izan ere, 2002an, Meldal eta bere laguntzaileek 1,2,3-triazolen sintesia deskribatu zuten, CuI eta DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) erabiliz disolbatzaile organiko desberdinetan[19]. Handik gutxira, Sharplessen ikerkuntza taldeak kobrez (II) sulfato pentahidratoaren eta sodio askorbatoaren erabilera deskribatu zuen heteroziklo berdinak sintetizatzen[27]. Bi ikertzaile-taldeek, bakoitzak bere aldetik, kobrezko katalizatzaile bat erabiltzeko erreakzioaren abiadura izugarri areagotzen zuela deskribatu zuten, abiadura-erreakzioa 10^7 aldiz handiagoa izatea lortu baitzuten. Are gehiago, baldintza horietan erreakzioa guztiz erregioselektiboa izatea lortu zuten, soilik 1,4 isomeroa eskuratuz[19,27]. Horretaz gain, erreakzioa giro tenperaturan eta ura disolbatzaile moduan erabiliz burutu zitekeela deskribatu zuten[19,27,28]. Une hartatik aurrera, eta batez ere erreakzio honen ortogonaltasunari esker, hots, selektibitate altuari esker, kobrez katalizaturiko azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioa, normalean CuAAC laburtua eta azida-ino bezala ere ezagutua, oso erabilia izan da hainbat eremutan[15,25,28].

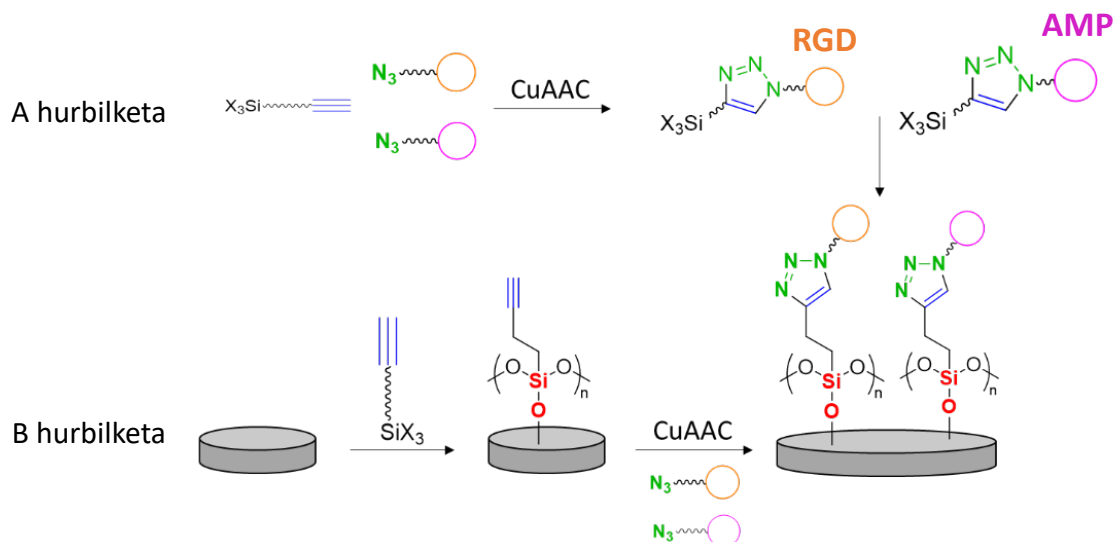
Gainazalen kimikari dagokionez, CuAAC erreakzioa hainbat aktibitate biologiko dituzten molekular gainazal metaliko edo polimerikoen gainean itsasteko erabili da. Testuinguru horretan, gure ikerketa-taldean egindako lana aipatu beharrekoa da, aktibitate antiinflamatorioa duen indometazina farmakoaren biokonjugazioa aurrez eraldatutako PLLA substratuaren gainean hain zuzen ere (**2. eskema**)[29].



2. eskema. Indometazina antiinflamatorioaren biokonjugazioa CuAACren bidez aurrez eraldatutako PLLA filmaren gainean.

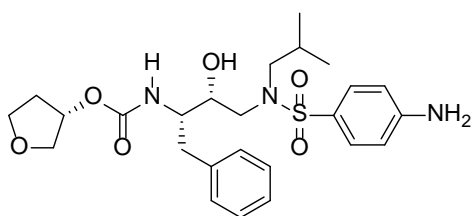
Lin eta kolaboratzaileek titaniozko gainazalaren gainean aldi bereko bi peptidoren biokonjugazioa burutzeko metodologia bat garatu zuten CuAAC erreakzioa erabiliz. Lan honetan, **3. eskeman** ikusten den moduan (**A hurbilketa**), mikrobioen aurkako peptidoak (AMP) eta azido arginilglizilaspartikodun

peptidoak (RGD), amaierako amino taldeak dituzten polietilenglikolarekin (PEG) erreakzionarazi ziren. Hau da, amina taldeak dituzten peptidoak azida-PEG24-azido karboxiliko edo azida-PEG12-azido karboxilikoarekin amidatu ziren, ondorengo klik erreakzioa burutzeko beharrezkoa den azida taldea sartzeko asmoz. Jarraian, peptido deribatu hauek amaierako alkino batekin ordezkaturata zegoen agente sililatu batekin erreakzionarazi ziren. Metodologia horren azken urratsa gainazal metalikoaren gaineko biokonjugazioa burutzeko da. Alabaina, egile berberak proposatutako metodologiak muga bat izan zezakeela iradoki zuten, izan ere, titanioaren gainazalari itsatsitako hidroxilo taldeek lotura peptidikoekin erreakziona zezaketen. Arazoa konpontzeko bigarren hurbilketa bat proposatu zuten, hau ere klik kimikan oinarritua. Kasu honetan, lehen aipatutako deribatu sililatuak, aldeztu aurretik metalaren gainazalarekin erreakzionarazi ziren, eta, ondoren, kobreak presentzian, klik erreakzioa gauzatu zen (**3. eskema, B hurbilketa**)[30,31].

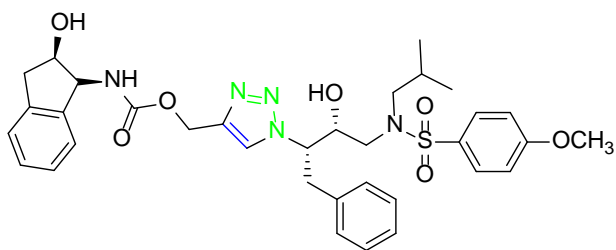


3. eskema. Titaniozko gainazalaren gaineko bi peptidoren biokonjugazioa CuAAC erreakzioaren bidez.

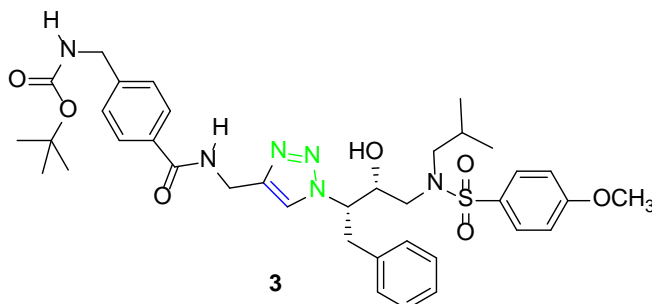
Klik kimikaren abantailez baliatu den beste eremu bat kimika medikoa da, izan ere, oso metodologia aproposa da farmako berrien garapenerako. **3. irudian** HIV-1 proteasa inhibitzailea den amprenavir (**1**) eta farmako honen bi analogoen egiturak aurkezten dira. Brink eta kolaboratzaileek CuAAC zikloadizioaren bidez prestatu zituzten analogo hauek (**2** eta **3**) eta HIV-1 proteasarekiko egitura kokristalinoak prestatu ondoren, bi analogoak amprenavir entzimarekin lotzen den leku berean lotzen direla frogatu zuten[32]. Izan ere, 1,2,3-triazola lotura peptidikoaren isostero bikaina dela konposatu hauetan konfirmatu zuten[33]. Hau da, 1,2,3-triazol eraztunak deribatu peptidikoaren antzeko bioaktibitatea duela frogatu zuten. Are gehiago, 1,2,3-triazol sistemak baditu zenbait abantaila peptidoen lotura amidikoaren aldean, hala nola, hidrolisiarekiko egonkortasun handiagoa da.



amprenavir (1)



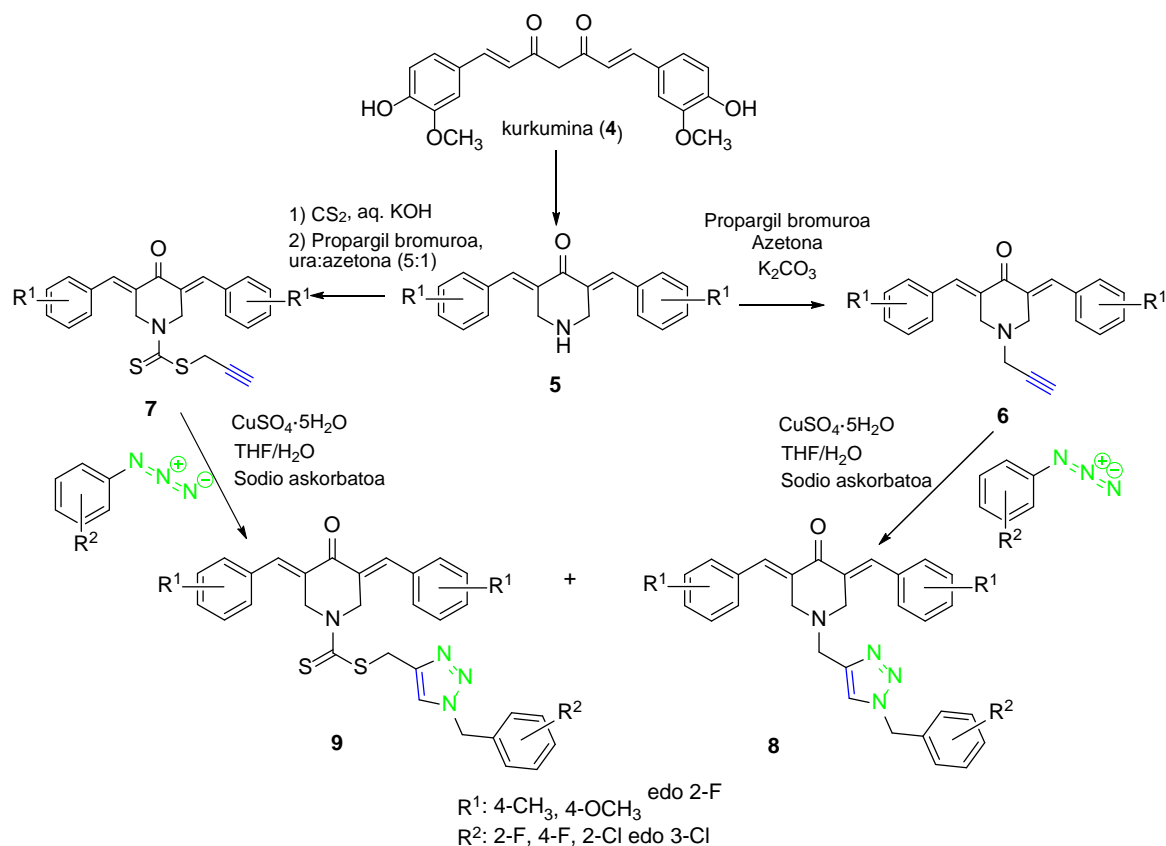
2



3

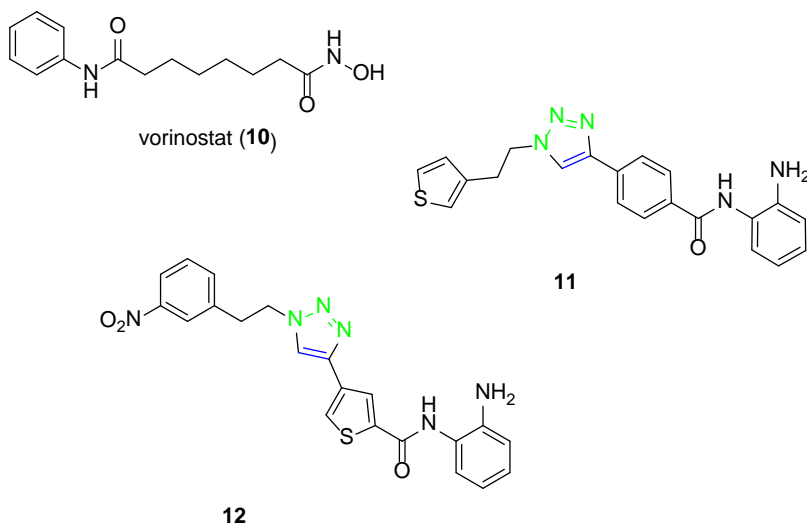
3. irudia. Amprenavir (1) farmakoaren eta CuAAC erreakzioaren bidez prestatutako bi analogoen (2 eta 3) egitura kimikoak.

Mandalapu eta kolaboratzaileek, kurkuminak (4) dituen hainbeste aktibitate farmakologiko kontuan hartuta, konposatu natural honetan oinarrituriko 1,2,3-triazolaren deribatuak sintetizatu zituzten (8 eta 9) CuAAC klik erreakzioaren bidez (4. eskema). Aipatzekoa da, kurkumina analogo hauek minbizi endokrinoaren aurkako jarduera dutela, SAR (“*Structure Activity Relationship*”) analisietan ikusi zen bezala. Izan ere, 9 konposatuak prostata minbiziaren zelulen aurkako jarduera duela ikusi zen, $IC_{50} = 8,8 \mu M$ PC-3 zeluletan eta $IC_{50} = 9,5 \mu M$ CU-145 zeluletan izanik, hurrenez hurren. Gainera, 4-metil taldea R^1 posizioan eta 4-fluoruro taldea R^2 posizioan dituen 9 konposatuak, kurkuminak baino jarduera hobea erakusten zuen prostata minbizi zelulen (PC-3 eta CU-145) aurka. Halaber, 9 konposatu honek bular minbiziaren zelulen aurkako jarduera ere baduela demostratu zuten SAR analisiek, MCF-7 zeluletan $IC_{50} = 6 \mu M$, MDA-MB-231 zeluletan $IC_{50} = 10 \mu M$, eta 4T1 zeluletan $IC_{50} = 6,4 \mu M$ emaitzak lortuz[34].



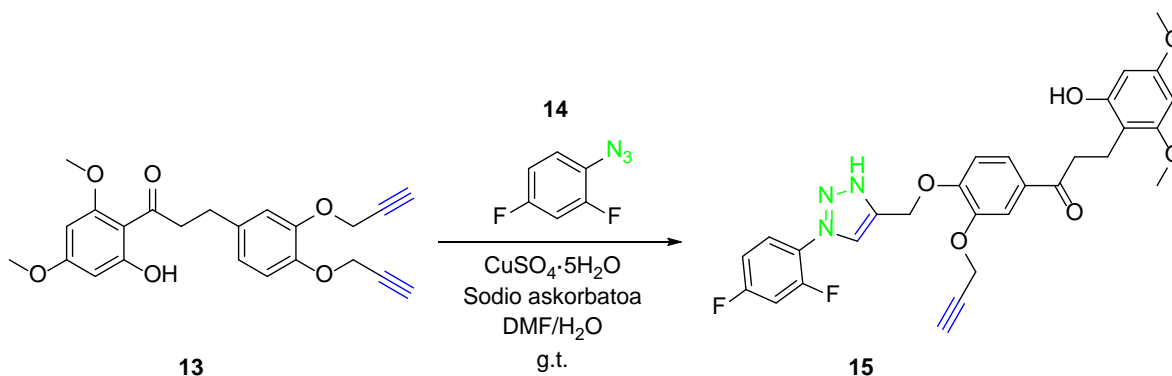
4. eskema. Kurkuminaren 8 eta 9 deribatuaren prestaketa.

Beste adibide bat, Suzuki eta kolaboratzaileek aurkeztu zuten. Izan ere, ikertzaile hauek histona desazetilasa 3-ren (HDAC3) kontrako inhibitzaile selektiboak eta eraginkorrak diren bi konposatu eratu zituzten, **11** eta **12** hain zuzen ere (**4. irudia**). Konposatu hauek sintetizatzeko CuAAC erreakzioa erabili zuten. Gainera, esan beharra dago, aktibitatea aztertzeko erreferentziatzat hartutako konposatua, vorinostat (**10**), inhibitzaile ez selektiboa dela, eta histona desazetilasa desberdinak, HDAC, HDAC1, HDAC6 eta HDAC8, inhibitzeko gaitasuna duela. Hala ere, klik kimikaren bidez lorturiko konposatuek HDAC3-rekiko selektibitatea erakusten dute[35].



4. irudia. Vorinostat (10) eta CuAAC erreakzioaren bidez lorturiko bi deribatuen (11 eta 12) egitura kimikoa.

CuAAC erreakzioaren bidez, minbiziaren aurkako aktibitatea duten konposatuak eratzeaz gain, bakterioen aurkako aktibitatea duten konposatuak ere prestatu dira[15]. Esate baterako, aurretik alkino funtzio taldearekin eraldatua izan den kalkona deribatua **13**, **14** azida aromatikoekin erreakzionatu zuen, kobre (II) sulfato pentahidratoaren eta sodio askorbatoaren presentzian, **15** konposatua lortuz (**5. eskema**). Azken konposatu honek, ciprofloxacino farmakoarekin alderatuz, *S. aureus*, *P. aeruginosa* eta *K. pneumoniae* bakterioen aurkako jardura hobea duela ikusi da. Izan ere, kalkona eta flabonatik deribatutako konposatuak bakterioen aurkako aktibitate oso ona erakutsi dute farmako desberdinekin konparatuz[36].



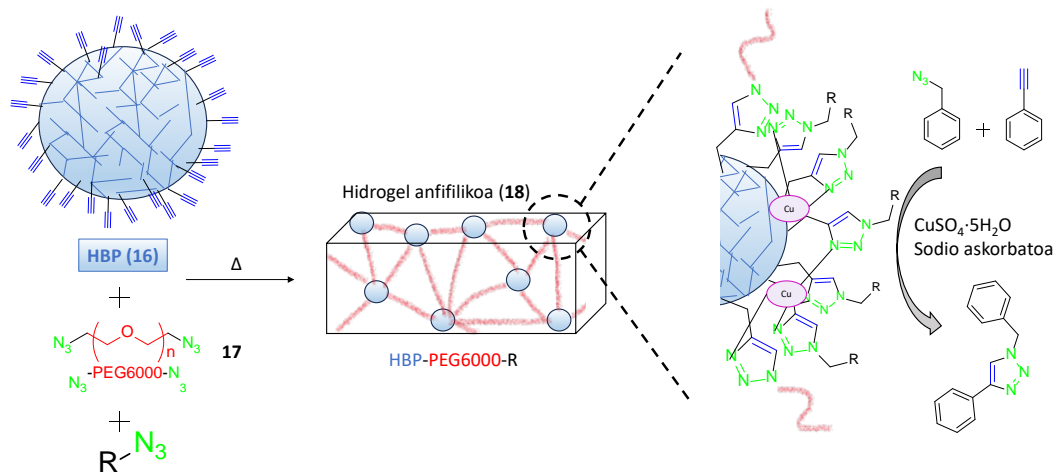
5. eskema. Bakterioen aurkako aktibitatea duen konposatuaren prestakuntza azida-alkino klik erreakzioaren bidez.

Beraz, kobrez katalizaturiko klik erreakzioaren bidez kimika medikoan balizko aplikazioa duten konposatu ugari era daitezke, erreakzio honen propietateei esker, hala nola zinetika azkarra, etekin kuantitatiboak, azpiproduktuen sortze minimoa, eta kimioselektibitate eta erregioselektibitate altuak[5,15].

Bestalde, materialen kimikari dagokionez, klik kimikak polimerizazio metodo eraginkorra dela erakutsi du. Izan ere, propietate aurreratuak dituzten hainbat material berri sintetizatzeko erabili izan da. Hala nola, gailu optikoak, 3D inprimaketarako materialak, edo forma-memoria duten polimeroak, besteak beste. Horretaz gain, klik erreakzio hauek abantaila ugari eskaintzen dituzte polimeroetan, batez ere,

hidrogeletan, zeina gelifikazio prozesuaren eta sareraren parametroaren konbertsioa auresateko erraztasuna erakusten dute. Honen adibide bat, glizimidil azida (GAP) polimeroa da, CuAAC klik erreazioaren bidez gurutzatu zena. Erreakzio honetan, azida taldeak *bis*-propargil sukzinatuarekin (BPS) erreazioanatu zuen. Triazol-hodiaren deskonposizio exotermikoa (418 kJ/mol) azidarena (317 kJ/mol) baino bero-entalpia altuagoa izateak eta GAP-triazolaren propietate mekaniko hobeagoak izateak, aldezturik prestaturiko GAP uretano-sistema baino propultsore hobeak bihurtzen du[37]. Beste lan batean, gurutzatze fenolikoak dituzten epoxi termoegonkorak azida-ino klik erreazioaren bidez lortu ziren[38]. Horretarako, propargilatoretan eraldaturiko fenol formaldehido erretxina, novolac izenaz ezagutua, eta *bis* azido hidroxi propiliter bisfenol A sintetizatu eta gurutzatu ziren klik erreazioaren bidez, termikoki itzulgarriak diren epoxi novolac erretxinak lortuz. Gurutzaketa erreazioa katalizatzaile gabe 130 °C-tan ematen da, baina Cu₂I₂ katalizatzaile gisa erabilia, tenperatura jaisten da 74 °C -tara[39]. Halaber, adar anitz eta talde azetilenikoak dituen polifenilenoa (hbPPh) molekula txikia den 1,3,5-*tris*(azidometil)benzenoarekin (TAMB) gurutzatzen da, film bat sortuz, termikoki edo fotokimikoki[40].

Materialen kimikan, forma-memoria duten polimeroak eratzeaz gain, hidrogel anfililiko gurutzatuak ere CuAAC klik erreazioaren bidez eratu dira. Hidrogel hauek lortzeko, adar anitzeko poliester bat (HBP) (16) pisu molekular desberdinetako PEG-diazidekin (17) erreazioanatu zen azida-ino klik erreazioaren bidez. Hidrogelan sorturiko 1,2,3-triazola kobre katalizatzailearen estekatzailer moduan erabili zuten, modu honetan, azida-alkino klik erreazioetan katalizatzaile gisa erabiltzeko (6. eskema). Aipatu beharra dago, hidrogelaren aktibitate katalitiko hobetu zela hidrogela konposatu hidrofobikoekin estali zenean. Izan ere, hidrogel sarea lortu ondoren, gainazalean erreazioanatu gabe geratu diren alkino taldeak azida funtzio taldea duten konposatu hidrofobikoekin erreazioanarazi ziren, jake moduko estaldura hidrofobikoak lortuz. Estaldura hidrofobikoen artean, *para*-metilbenzilazidak (*p*-MeBA) zuten hidrogela aktibitate katalitiko onenak erakutsi zituen. Izan ere, etekin hobeak lortzen dira azida-alkino klik erreazioan, erreazio selektiboagoa izanik. Horretaz gain, esan beharra dago, katalizatzaile gisa erabiltzen diren hidrogel hauek oso erraz birziklatzen direla, metanolarekin garbituz[41].



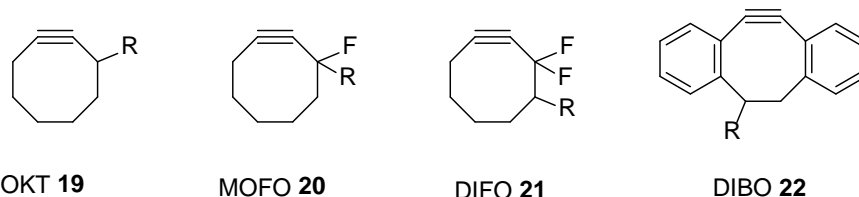
6. eskema. Anfililikoak diren HBP hidrogelen (18) prestakuntza eta eratutako triazol eratzunen konplexazioa kobre ioiekin azida-alkino klik erreazioetan katalizatzaile gisa erabiltzeko.

3. KIMIKA BIO-ORTOGONALA. 3. SARITUA

2003. urtean, Carolyn Bertozzik erreazioak sistema biologikoetan burutzeko jakinguran, “kimika bio-ortogonal” termino berria sortu zuen[42]. Erreakzio bio-ortogonalak sistema zelularretan ematen diren erreazio oso selektiboak dira. Izan ere, erreazio hauetan parte hartzen duten osagaiak ez dute elkarrekintzarik ezta albo erreazioerik sortu behar ingurune biologikoan dauden beste

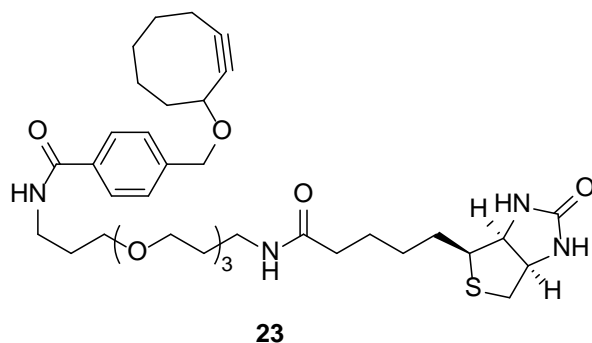
substantziekin[43–45]. Gogoan izan behar da, sistema biologikoak, hau da, zelulak, ingurune urtsuak direla, eta konposatu kimiko ugari dituztela, besteak beste, proteinak, karbohidratoak, lipidoak, azido nukleikoak eta ioi ez-organikoak. Beraz, erreakzio bio-ortogonalek elkarrekin selektiboki erreakzionatzen duten funtzio-taldeak inplikatu behar dituzte, funtzionalitate biologikoekiko erreakzioak saihestuz. Gainera, erreakzio hauek, ingurune urtsuan burutu behar dira presio eta tenperatura altuak behar izan gabe. Beste aldetik, erreakzio honetan parte hartzen duten erreaktiboak ezin dira ez oxigenoarekiko ez zelularen ingurune erreduzitzailearekiko sentikorrak izan behar. Jakina, erabilitako konposatuak eta sortutako produktuak ez dira zitotoxikoak izan behar[43,46].

Aurreko atalean aipaturiko azida eta alkinoen arteko 1,3-zikloadizio dipolar klik erreakzioak baldintza horiek guztiak betetzen ditu, bat izan ezik. Izan ere, katalizatzaile moduan erabiltzen diren kobrearen gatzek zitotoxizitatea erakusten dute eta eragina dute zelulen metabolismoan[47]. Hona hemen 2022. Urteko Nobel saria jaso duen emakumearen ekarpenik garrantzitsuena. Bertozzik, azidek, 1,3 dipolarofilo ahulak direnak, 1,3 zikloadizio dipolarretan parte har zezaten giro-tenperaturan eta katalizatzailerik gabe, arrazoizko abiadurekin, alkinoak aktibatu behar zirela proposatu zuen. Horretarako, hau da, alkinoen erreaktibitatea bizkortzeko, Bertozzi eta kolaboratzaileek 1960an deskribatutako Wittig eta Krebsen alkeno eta alkino tentsionatuei buruzko lan klasikoetan oinarritu ziren[2]. Autore horien arabera, zikloektinoak, oktino zikliko egonkor txikiak, fenilazidarekin erreakzionatzen zuen "eztanda-abiadura" produktu bakarra emanez, triazola hain zuzen[48]. Izan ere, zikloalkinoak duen eraztunaren tentsioak zikloalkino eta azidaren arteko erreakzioa azkarra eta espontaneoa izatea ahalbideratzen du. Oktino ziklikoaren (OKT) **19** angelua oktino linealaren angeluarekin alderatuz, 163° eta 180° hurrenez hurren[49], 18 kcal/mol inguruko eraztun-tentsioa sortarazten du[50,51]. Deformazioaren bidezko zikloadizio erreakzio hauek, *strain promoted alkyne azide cycloaddition* reactions bezala (SPAAC) ere ezagutuak, ez dute katalizatzaile metalikorik behar eta erreakzio-abiadura azkartzeko ordezkatzaila gisa elektroierakarleak dituzten zikloektinoak erabiltzen dira[50,51]. Esaterako, fluor talde funtzionalarekin mono- eta di- ordezkaturako zikloektinoak (MOFO **20** eta DIFO **21**) erabiltzean, abiadura ordena bikoiztea edota 10 aldiz areagotzea lortu da[52]. Azken urteetan, dibentzooktino konposatuak (DIBO), **22**, arrakasta ugari izan dute erreakzio abiadura izugarri handiagotzen dutelako (**5. irudia**)[53,54]. Hala ere, dibentzooktinoaren deribatu hauek sintetizatzea nahiko zaila eta garestia izaten da.



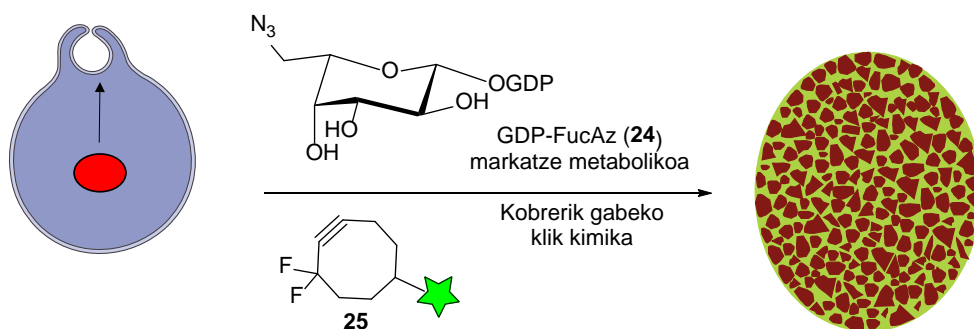
5. irudia. SPAAC erreakzioetan gehien erabiltzen diren zikloektino deribatuak.

Izan ere, Bertozzi eta laguntzaileek biotinatik eratorritako ordezkatu gabeko zikloektinoa **23** (**6. irudia**) prestatu zuten eta azida desberdinekin erreakzionarazi zuten baldintza fisiologikoetan, kasu guztietan bi triazol erregioisomeroen nahasketa ekimolekularrak lortuz[55].



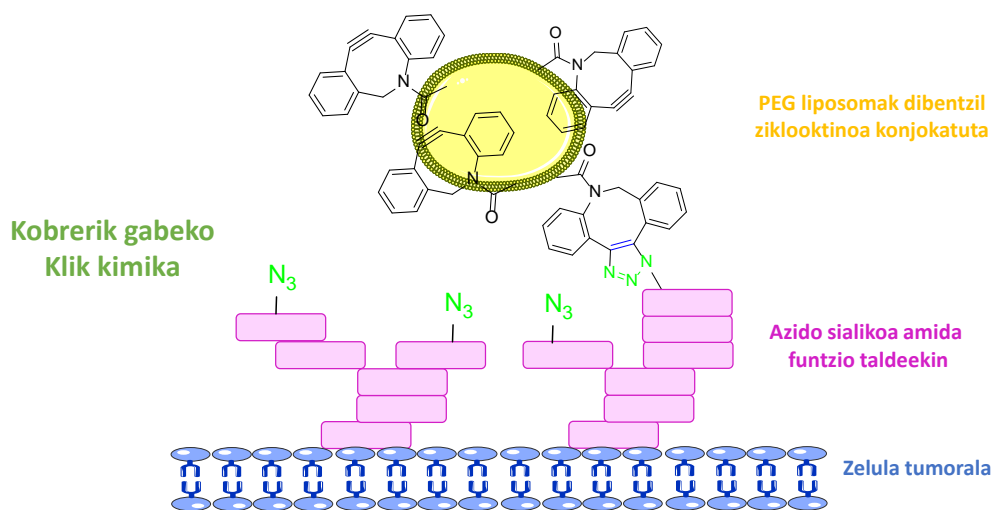
6. irudia. Bertozzi eta laguntzaileek biotinatik eratorritako prestatutako ziklootinoaren **23** egitura.

Are gehiago, bere ikerketaren hurrengo urratsa erreakzio hori biomolekulen markatze kobalenterako erabiltzea izan zen zelula biziak erabiliz (**7. eskema**). Bertozzi eta bere kolaboratzaileak, erreakzioa burutzerakoan, ez zela zelula-kalterik gertatzen ohartu ziren[55]. Izan ere, fukosa analogoen azida deribatuak **24** erabiliz, zebra arrain enbrioien gainazal zelularra markatu zuten, gero sartutako azida taldeak SPAAC erreakzioaren bidez detektatzeko. Horretarako, difluorduna den ziklootino sonda **25** erabili zuten[56].



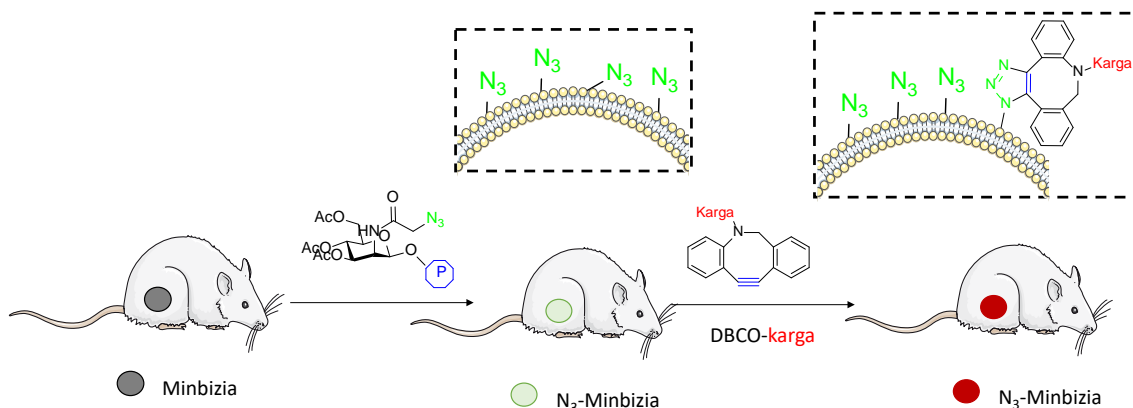
7. eskema. Azida taldea duten fukosa analogoen **24** sartzea zebra-arrain enbrioietan eta azida talde hauen detekzioa kobrerik gabeko azida-ino klik kimika erabiliz.

Kobrerik gabeko klik erreakzioa beste aplikazio batzuk izan ditu eremu biologikoan. Esate baterako, minbiziaren kontrako farmakoak daramatzaten nanopartikulak selektiboki minbizian metatzeko estrategia bezala. Izan ere, bere egituran azida taldeak dituen eta larrosaz markaturik dagoen azido sialikoaren deribatuak minbizian artifizialki eratzen dira glikoingenieritza metabolikoaren bidez. SPAAC erreakzioaren bidez, nanopartikulak azida taldea duen azido sialikoaren deribatuarekin elkartzen dira modu selektiboan. Modu honetan, minbiziaren aurkako farmakoak dituzten nanopartikulen metaketa eragiten da tratatzen ari den tumorean, nanopartikulen diana tumoral kontrolatuz (**7. irudia**)[57].



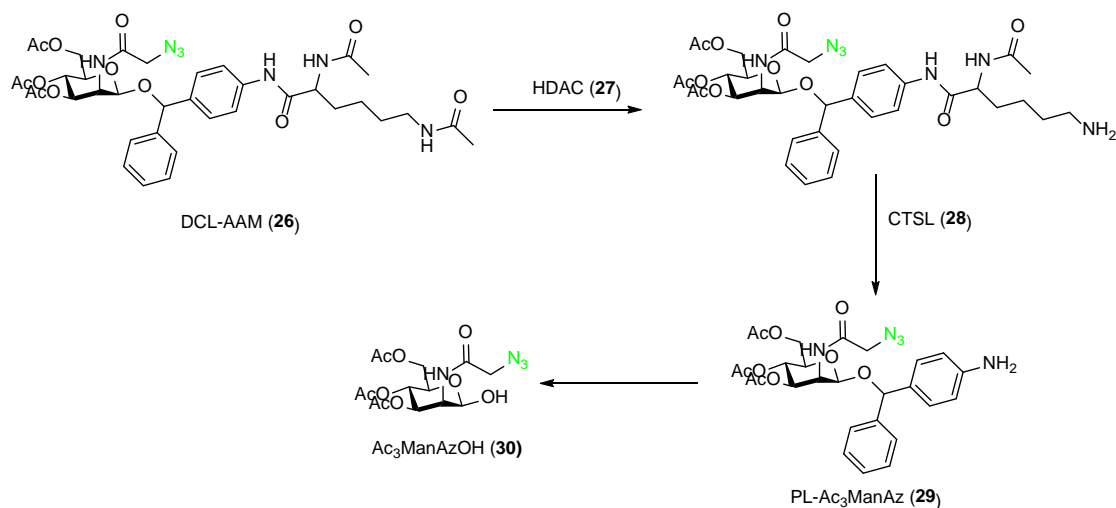
7. irudia. Nanopartikulen *in vivo* estrategia diana tumoralaren aurka kobrerik gabeko klik erreakzio bio-ortogonalaren bidez.

Izan ere, glikoingenieritza metabolikoak zelulen gainazalean talde bio-ortogonalak artifizialki finkatzeko metodologia aproposa dela frogatu egin da. Adibidez, Cheng eta kolaboratzaileek tumore-zelulak selektiboki etiketatzeko gaitasuna duen azukrea diseinatu zuten azida taldeekin (**8. irudia**)[58,59].



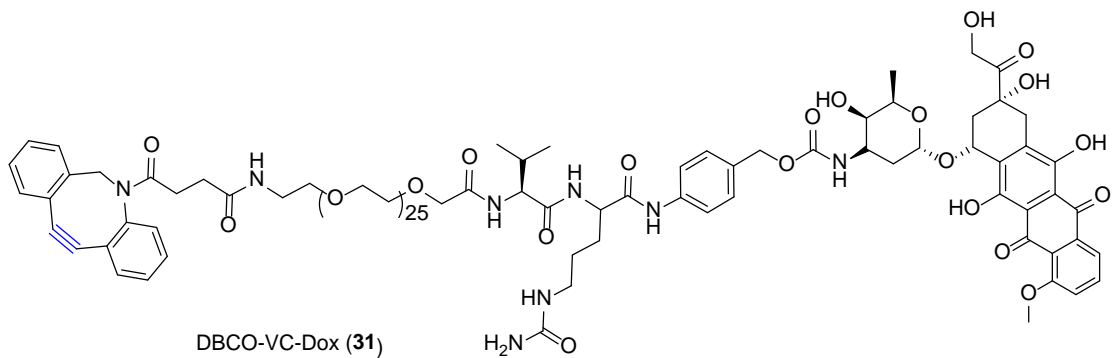
8. irudia. Klik kimikan oinarritutako ehunen segmentazio aktiboa (ATTACK).

Tumore-zelulen markatze espezifiko lortzeko, HDAC (**27**)/katepsin L (CTSL) (**28**)-rekiko sentikorra den tetraazetil-*N*-azidaazetilmanosamina (Ac₄ManAz edo DCL-AAM izenez laburtua) (**26**) deribatua eraiki zen. Horretarako, entzima erauzgarri gisa erabiltzen den *N,N'*-*L*-diazetilisina banatu zen HDAC eta CTSL erabiliz. Entzima dualaren hidrolisiaren ondoren, DCL-AAM-aren egitura berrantolatua zen eta aktiboa den triazetil-*N*-azidaazetilmanosamina (Ac₃ManAzOH) (**30**) berehala askatu zuen azida taldeekin markaturiko zelularen mintzera (**8. eskema**).



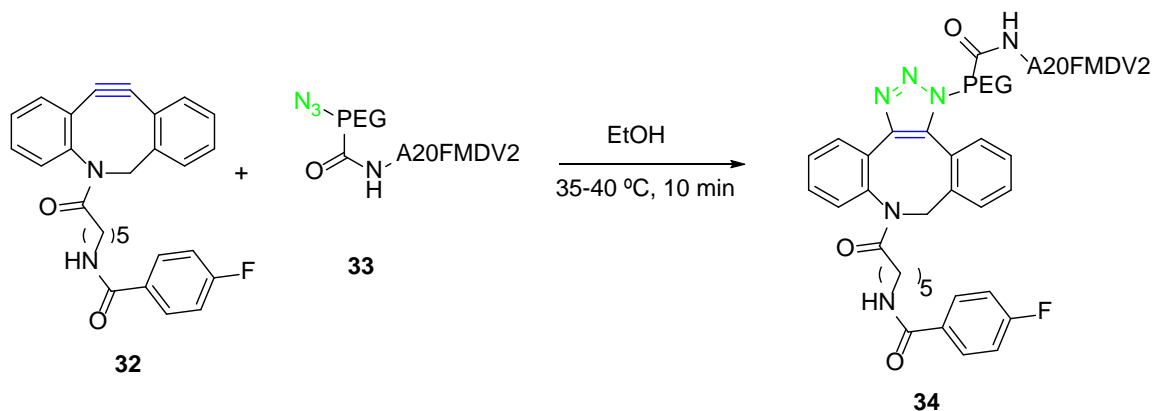
8. eskema. DCL-AAM-ren (26) degradazio-mekanismoa.

Era berean, dibentoziklootino taldea (DBCO)-doxorribizina(DOX) profarmakoa (DBCO-VC-Dox) (31) (9. irudia) azida funtzio taldez inguraturiko zelula mintzera konjugatu zen kimika bio-ortogonalaren bidez. Ondoren, B katepsinak parte harturiko hidrolisi entzimatiakoaren menpe jarritz, DOX aktiboa askatu zen. DCL-AAM eta DBCO-VC-Dox arteko formulazioak tumorearen hazkundera inhibitzen duela ikusi zen eta modu honetan, bizi denbora luzatuz. Horrez gain, sistema bio-ortogonalak biriketako minbiziaren metastasia eta toxikotasuna gutxitu zuen. Hala ere, klik kimikan oinarritutako ehun aktiboen estrategiak (ATTACK), bioaktiboak diren molekula endogeno ezberdinei erantzuten dieten beste azukre deribatu batzuk are gehiago garatzeko helburua du.



9. irudia. DBCO-VC-Dox (31) egitura kimikoa.

Horren ondoren, kobrerik gabeko azida-alkinoen 1,3-zikloadizio dipolarra beste hainbat aplikazioetarako erabili izan da. Esate baterako, Hausner eta kolaboratzaileek klik erreakzioa α,β_6 integrinaren erradiomarkatzerako ere erabil zitekeela ikusi zuten (9. eskema)[60]. Hau da, 34 konposatua deformazioak bultzaturiko ziklootinoaren (32) eta funtzionalizaturiko azidaren (33) klik erreakzio baten bidez sintetizatu zen, % 99 purutasunarekin. Gainera, lotura zelularreko esperimenduek erakutsi zuten markaturiko [¹⁸F]FBA-C6-ADIBON3-PEG7-A20FMDV peptidoak (34) afinitate eta espezifikitate ona erakusten duela α,β_6 adierazten duten zelulekiko[33]. Halaber, biodistribuzio *in vivo* eta PET analisisiek demostratu dute erradioaktibitatea azkar eliminatzen dela odoletik eta ehun guztietatik. Beraz, esan daiteke klik kimika erabilgarria eta erraza den erreakzioa dela, minbizira bideraturiko peptidoen markatzea egiteko[15].



9. eskema. 34 erradiomarkatzailearen prestaketa kobrerik gabeko klik erreazioaren bidez.

4. ONDORIOAK

2022. urteko Kimikako Nobel Saria Morten Meldalek, Karl B. Sharplessek eta Carolyn R. Bertozzik jaso zuten lehengo biak klik kimika sortzeagatik eta azkenak erreazio bio-ortogonalak garatzeagatik. Aipatu beharra dago, erreazio honi esker, erabilera desberdinetarako produktuak modu azkar, simple eta eraginkorrean presta daitezkeela. Izan ere, klik kimikaren garapenari esker farmako ugari sintetiza daitezke modu azkar eta eraginkor batean, propietate nabarmenak dituzten material berritzaileen ekoizteaz gain. Ikertzaile horien lanek aurrerapenak ekarri dituzte kimikan, biologian eta medikuntza arloetan, eta bestela posible izango ez ziren emaitzak lortzea ahalbidetu du. Izan ere, zientzialari horien ekarpenen ondorioz, hainbat eremutan, hala nola irudi-tekniketan, diagnostikoan eta sendagaien banaketan pauso erraldoiak eman dira aurrerantz. Esate baterako, klik kimikak sistema biziak eta bertan gertatzen diren prozesuak hobeto ulertzen lagundu du, eta gaixotasunen tratamenduen eta diagnostiko-agente eraginkorrago eta selektiboagoen garapenetan ekarpen nabarmena izan du. Beraz, erreazio hauen potentziala dela eta oso baliagarri bihurtu dira hainbat konposaturen eraikuntzan. Hala ere, metodologia hauen aplikazioa ez da amaierara iritsi, erreazio hauetan oinarrituz aurrerapen gehiago egingo baitira.

5. ESKER ONAK

Egileek sostengu ekonomikoa eskertzen dute (ELKARTEK PROGRAMA KK-2021-/00025)

6. BIBLIOGRAFIA

- [1]. 2022. <<Click Chemistry and Bioorthogonal Chemistry>>. *The Royal Swedish Academy of Sciences*. 1–18.
- [2] BOYCE, M., MALAKER, S. A., RILEY, N. M., KOHLER, J. J. 2023. <<The 2022 Nobel Prize in Chemistry-sweet!>>. *Glycobiology*, **33**, 178–181.
- [3] ZAIA, J. 2023. <<The 2022 Nobel Prize in Chemistry for the development of click chemistry and bioorthogonal chemistry>>. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **415**, 527–532.
- [4] AULT, A. 2002. <<The Nobel Prize in Chemistry 2001>>. *Chemical Education*, **79**, 572–577.

- [5] KOLB, H. C., FINN, M. G., SHARPLESS, K. B. 2001. <<Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions>>. *Angewandte Chemie - International Edition*, **40**, 2004–2021.
- [6] HOU, J., JIE, S., ZHAO, G., WANG, P. 2012. <<The impact of click chemistry in medicinal chemistry>>. *Expert Opinion in Drug Discovery*, **7**, 489–501.
- [7] ROCKWELL, S. 2003. <<The Life and Legacy of Marie Curie>>. *Journal of Biology and Medicine*, **76**, 167–180.
- [8] DANYLOVA, T. V., KOMISARENKO, S. V. 2021. <<A legend in his own lifetime: double nobel prize winner Linus Pauling>>. *Ukrainian Biochemical Journal*, **93**, 123–132.
- [9] SHAMPO, M. A., KYLE, R. A. 2002. <<Frederick Sanger-Winner of 2 Nobel Prizes>>. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*, **77**, 212.
- [10] CHARYTON, C., ELLIOTT, J. O., RAHMAN, M. A., WOODARD, J. L., DEDIOS, S. 2011. <<Gender and Science : Women Nobel Laureates>>. *Journal of Creative Behavior*, **45**, 203–214.
- [11] SA. 2023. <<the 2023 Nobel Prize in Physiology or Medicine>>.
- [12] RSAS. 2008. <<The Prize in Economic Sciences 2023>>. *Journal of International Economics*, **1**, 1–4.
- [13] INSTITUTE, T. N. N. 2023. <<Nobel Peace Prize 2023>>, **1**, 1–2.
- [14] LI, X., XIONG, Y. 2022. <<Application of “Click” Chemistry in Biomedical Hydrogels>>. *ACS Omega*, **7**, 36918–36928.
- [15] KAUR, J., SAXENA, M., RISHI, N. 2021. <<An Overview of Recent Advances in Biomedical Applications of Click Chemistry>>. *Bioconjugate Chemistry*, **32**, 1455–1471.
- [16] SUÁREZ, A. 2012. <<Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre>>. *An. Quím*, **108**, 306–313.
- [17] MOHAMMAD MAHDI DADFAR, S., SEKULA-NEUNER, S., TROUILLET, V., HIRTZ, M. 2018. <<A Comparative Study of Thiol-Terminated Surface Modification by Click Reactions: Thiol-yne Coupling versus Thiol-ene Michael Addition>>. *Advanced Materials Interfaces*, **5**, 1–9.
- [18] LI, H., WANG, J., SUN, J. Z., HU, R., QIN, A., TANG, B. Z. 2012. <<Metal-free click polymerization of propiolates and azides: facile synthesis of functional poly(aroxycarbonyltriazole)s>>. *The Royal Society of Chemistry*, **3**, 1075–1083.
- [19] TORNØE, C. W., CHRISTENSEN, C., MELDAL, M. 2002. <<Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides>>. *Journal of Organic Chemistry*, **67**, 3057–3064.
- [20] TORREGROSA, R., PASTOR, I. M., YUS, M. 2005. <<Isoprene-catalyzed lithiation of imidazole: synthesis of 2-(hydroxyalkyl)- and 2-(aminoalkyl) imidazoles>>. *Tetrahedron*, **61**, 11148–11155.

- [21] GANGULY, T., KASTEN, B. B., BUCAR, D.-K., MACGILLIVRAY, L. R., BERKMAN, C. E., BENNY, P. D. 2011. <<The hydrazide/hydrazone click reaction as a biomolecule labeling strategy for M(CO)₃ (M = Re, ^{99m}Tc) radiopharmaceuticals>>. *The Royal Society of Chemistry*, **47**, 12846–12848.
- [22] SIU, T., YUDIN, A. K. 2002. <<Practical Olefin Aziridination with a Broad Substrate Scope>>. *Journal of American Chemical Society*, **124**, 530–531.
- [23] HOYLE, C. E., BOWMAN, C. N. 2010. <<Thiol-ene click chemistry>>. *Angewandte Chemie - International Edition*, **49**, 1540–1573.
- [24] GACAL, B., DURMAZ, H., TASDELEN, M. A., HIZAL, G., TUNCA, U., YAGCI, Y., DEMIREL, A. L. 2006. <<Anthracene - Maleimide-Based Diels - Alder “Click Chemistry” as a Novel Route to Graft Copolymers>>. *Macromolecules*, **39**, 5330–5336.
- [25] AGRAHARI, A. K., BOSE, P., JAISWAL, M. K., RAJKHOWA, S., SINGH, A. S., HOTHIA, S., MISHRA, N., TIWARI, V. K. 2021. <<Cu(I)-Catalyzed Click Chemistry in Glycoscience and Their Diverse Applications>>. *Chemical Reviews*, **121**, 7638–7956.
- [26] HUISGEN, R. 1963. <<1,3-Dipolar Cycloadditions>>. *Angewandte Chemie International Edition*, **2**, 565–632.
- [27] ROSTOVTSSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V., SHARPLESS, K. B. 2002. <<A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes>>. *Angewandte Chemie - International Edition*, **41**, 2596–2599.
- [28] SPICER, C. D., PASHUCK, E. T., STEVENS, M. M. 2018. <<Achieving Controlled Biomolecule-Biomaterial Conjugation>>. *Chemical Reviews*, **118**, 7702–7743.
- [29] SÁNCHEZ-BODÓN, J., RUIZ-RUBIO, L., HERNÁEZ-LAVIÑA, E., VILAS-VILELA, J. L., MORENO-BENÍTEZ, M. I. 2021. <<Poly(L-lactide)-Based Anti-Inflammatory Responsive Surfaces for Surgical Implants>>. *Polymers*, **13**, 1–15.
- [30] CHEN, J., ZHU, Y., XIONG, M., HU, G., ZHAN, J., LI, T., WANG, L., WANG, Y. 2019. <<Antimicrobial Titanium Surface via Click-Immobilization of Peptide and Its in Vitro/Vivo Activity>>. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **5**, 1034–1044.
- [31] LIN, W., JUNJIAN, C., CHENGZHI, C., LIN, S., SA, L., LI, R., YINGJUN, W. 2015. <<Multi-biofunctionalization of a titanium surface with a mixture of peptides to achieve excellent antimicrobial activity and biocompatibility>>. *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 30–33.
- [32] BRIK, A., ALEXANDRATOS, J., LIN, Y. C., ELDER, J. H., OLSON, A. J., WLODAWER, A., GOODSSELL, D. S., WONG, C. H. 2005. <<1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors>>. *ChemBioChem*, **6**, 1167–1169.
- [33] LI, H., ANEJA, R., CHAIKEN, I. 2013. <<Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design>>. *Molecules*, **18**, 9797–9817.
- [34] MANDALAPU, D., SAINI, K. S., GUPTA, S., SHARMA, V., YASEEN MALIK, M., CHATURVEDI, S., BALA, V., HAMIDULLAH, THAKUR, S., MAIKHURI, J. P., WAHAJUDDIN, M., KONWAR, R.,

- GUPTA, G., SHARMA, V. L. 2016. <<Synthesis and biological evaluation of some novel triazole hybrids of curcumin mimics and their selective anticancer activity against breast and prostate cancer cell lines>>. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **26**, 4223–4232.
- [35] SUZUKI, T., KASUYA, Y., ITOH, Y., OTA, Y., ZHAN, P., ASAMITSU, K., NAKAGAWA, H., OKAMOTO, T., MIYATA, N. 2013. <<Identification of Highly Selective and Potent Histone Deacetylase 3 Inhibitors Using Click Chemistry-Based Combinatorial Fragment Assembly>>. *PLoS ONE*, **8**, 1–12.
- [36] KANT, R., KUMAR, D., AGARWAL, D., GUPTA, R. D., TILAK, R., AWASTHI, S. K., AGARWAL, A. 2016. <<Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities>>. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **113**, 34–49.
- [37] RESHMI, S. K., VIJAYALAKSHMI, K. P., THOMAS, D., ARUNAN, E., REGHUNADHANNAIR NAIR, C. P. 2013. <<Glycidyl azide polymer crosslinked through triazoles by click chemistry: Curing, mechanical and thermal properties>>. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, **38**, 525–532.
- [38] SUNITHA, K., SANTHOSH KUMAR, K. S., MATHEW, D., REGHUNADHAN NAIR, C. P. 2013. <<Shape Memory Polymers (SMPs) derived from phenolic cross-linked epoxy resin via click chemistry>>. *Materials Letters*, **99**, 101–104.
- [39] KONURAY, O., FERNÁNDEZ-FRANCOS, X., DE LA FLOR, S., RAMIS, X., SERRA, À. 2020. <<The Use of Click-Type Reactions in the Preparation of Thermosets>>. *Polymers*, **12**, 1–44.
- [40] PÖTZSCH, R., VOIT, B. 2012. <<Thermal and photochemical crosslinking of hyperbranched polyphenylene with organic azides>>. *Macromolecular Rapid Communications*, **33**, 635–639.
- [41] GAYEN, A. K., PERALA, S. K., SCHAUENBURG, D., WEIL, T., RAMAKRISHNAN, S. 2023. <<Amphiphilic Polymer Hydrogel-supported Catalysts: Tuning the Accessibility to the Catalytic Site by Molecular Jacketing>>. *Chemistry - An Asian Journal*, **18**.
- [42] AGARD, N. J., PRESCHER, J. A., BERTOZZI, C. R. 2004. <<A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems>>. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 15046–15047.
- [43] BASKIN, J. M., BERTOZZI, C. R. 2007. <<Bioorthogonal click chemistry: Covalent labeling in living systems>>. *QSAR and Combinatorial Science*, **26**, 1211–1219.
- [44] SLETTEN, E. M., BERTOZZI, C. R. 2009. <<Bioorthogonal Chemistry : Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality Angewandte>>. *Angewandte Chemie - International Edition*, **48**, 6974–6998.
- [45] BERTOZZI, C. R. 2011. <<A decade of bioorthogonal chemistry>>. *Accounts of Chemical Research*, **44**, 651–653.
- [46] SCINTO, S. L., BILODEAU, D. A., HINCAPIE, R., LEE, W., NGUYEN, S. S., XU, M., AM ENDE, C. W., FINN, M. G., LANG, K., LIN, Q., PEZACKI, J. P., PRESCHER, J. A., ROBILLARD, M. S., FOX, J. M. 2021. <<Bioorthogonal chemistry>>. *Nature Reviews Methods Primers*, **1**, 1–23.

- [47] O'HERN, C. I. Z., DJOKO, K. Y. 2022. <<Copper Cytotoxicity: Cellular Casualties of Noncognate Coordination Chemistry>>. *mBio*, **13**, 1–4.
- [48] WITTIG, G., POHLKE, R. 1961. <<Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, II>>. *Chemische Berichte*, **94**, 3276–3286.
- [49] MEIER, H., PETERSEN, H., KOLSHORN, H. 1980. <<Die Ringspannung von Cycloalkinen und ihre spektroskopischen Auswirkungen>>. *Chemische Berichte Jahrgang*, **113**, 2398–2409.
- [50] DOMMERHOLT, J., RUTJES, F. P. J. T., VAN DELFT, F. L. 2016. <<Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides>>. *Topics in Current Chemistry*, **374**, 1–20.
- [51] BACH, R. D. 2009. <<Ring strain energy in the cyclooctyl system. the effect of strain energy on [3 + 2] cycloaddition reactions with azides>>. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 5233–5243.
- [52] LI, W., ZOU, J., ZHU, S., MAO, X., TIAN, H., WANG, X. 2019. <<Fluorodibenzocyclooctynes: A Trackable Click Reagent with Enhanced Reactivity>>. *Chemistry - A European Journal*, **25**, 10328–10332.
- [53] GORDON, C. G., MACKEY, J. L., JEWETT, J. C., SLETTEN, E. M., HOUK, K. N., BERTOZZI, C. R. 2012. <<Reactivity of biarylazacyclooctynones in copper-free click chemistry>>. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 9199–9208.
- [54] SAKATA, Y., NABEKURA, R., HAZAMA, Y., HANYA, M., NISHIYAMA, T., KII, I., HOSOYA, T. 2022. <<Synthesis of Functionalized Dibenzoazacyclooctynes by a Decomplexation Method for Dibenzo-Fused Cyclooctyne-Cobalt Complexes>>. *Organic Letters*.
- [55] AGARD, N. J., PRESCHER, J. A., BERTOZZI, C. R. 2004. <<A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems>>. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 15046–15047.
- [56] DEHNERT, K. W., BEAHM, B. J., HUYNH, T. T., BASKIN, J. M., LAUGHLIN, S. T., WANG, W., WU, P., AMACHER, S. L., BERTOZZI, C. R. 2011. <<Metabolic Labeling of Fucosylated Glycans in Developing Zebrafish>>. *ACS Chemical Biology*, **6**, 547–552.
- [57] KOO, H., LEE, S., NA, J. H., KIM, S. H., HAHN, S. K., CHOI, K., KWON, I. C., JEONG, S. Y., KIM, K. 2012. <<Bioorthogonal Copper-Free Click Chemistry In Vivo for Tumor-Targeted Delivery of Nanoparticles>>. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51**, 11836–11840.
- [58] XU, M., SUN, Y., ZHOU, X., YIN, Q., TANG, L., DOBRUCKI, I. T., DOBRUCKI, L. W., CHANEY, E. J., BOPPART, S. A., FAN, T. M., LEZMI, S., CHEN, X., YIN, L., CHENG, J. 2017. <<Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting>>. *Nature Chemical Biology*, **13**, 415–424.
- [59] WU, D., YANG, K., ZHANG, Z., FENG, Y., RAO, L., CHEN, X., YU, G. 2022. <<Metal-free bioorthogonal click chemistry in cancer theranostics>>. *Chemical Society Reviews*, **51**, 1336–1376.
- [60] HAUSNER, S. H., CARPENTER, R. D., BAUER, N., SUTCLIFFE, J. L. 2013. <<Evaluation of an

integrin $\alpha v \beta 6$ -specific peptide labeled with [18F] fluorine by copper-free , strain-promoted click chemistry>>. *Nuclear Medicine and Biology*, **40**, 233–239.