

Klik kimika: erabilera askotariko erreakzio Nobel sariduna

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. Sharpleskek jaso zuten, konposatu desberdina modu azkar eta eraginkorrean egiteko prozedura berria garatu zutelako, klik kimika deritzona. Klik erreakzioek hainbat abantaila aurkitzen dituzte: adibidez, esperimentalki errazak dira, erreakzio baldintza anitz toleratzen dituzte, oso selektiboak eta erregioespezifikoak dira eta etekin kuantitatiboak ematen dituzte. Gainera, ez dira oxigenoarekiko eta urarekiko sentikorak, eta isolatze etapa erraza duten erreakzioak dira. Horretaz gain, klik erreakzioak lau talde nagusitan banatu daitezke: ordezkapen nukleozalea, zikloadizioak, karboniloen erreakzio ez-aldolikoak eta C-C lotura anizkoitzen gaineko adizio erreakzioak. Aipatutako baldintzak betetzen dituzten erreakzioen artean, kobrez katalizatutako azida eta alkinino 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 duten molekula gainazal metaliko edo polimerikoen gainean biokonjugatzeko, farmako berriak garatzeko, propietate hobekak dituzten material termoeogonkorak garatzeko eta katalizatzaile gisa erabil 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 daramatzaten 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 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.

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

Nola aipatu / How to cite: Diaz-Galbarriatu, Maria; Sánchez-Bodón, Julia; Moreno-Benítez, Isabel; Vilas-Vilela, José Luis (2024). «Klik kimika: erabilera askotariko erreakzio Nobel sariduna». *Ekaia*, 46, 2024, 87-107. (https://doi.org/10.1387/ekaia.25485).

Jasotze-data: 2023, azaroak 22; Onartze-data: 2024, otsailak 12.

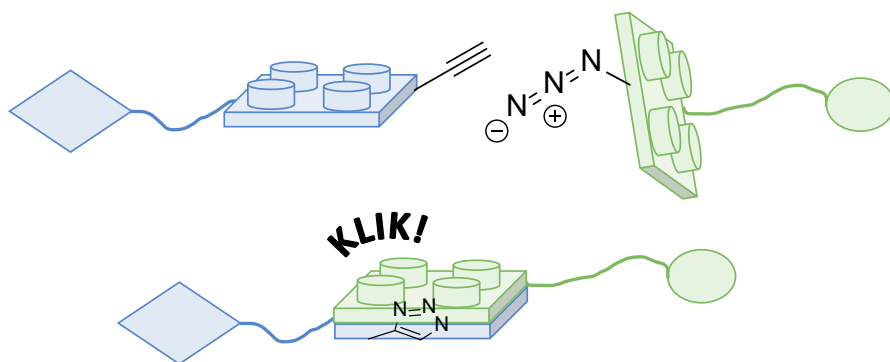
ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © UPV/EHU Press



Lan hau Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-PartekatuBerdin 4.0 Nazioartekoa lizentzia baten mende dago

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 eraman zuen, 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 aurkikuntzengatik [11]. Aurten ere, Claudia Goldin ekonomista eta akademika estatubatuarrek Nobela irabazi du ekonomia arloan, lan merkatuan aurkitzen diren genero diferentziak aurkezteagatik [12], eta Narges Mohammadi-k, Irango giza eskubideen aldeko ekintzaile honek, Bakezko Nobel saria jaso izan du [13].

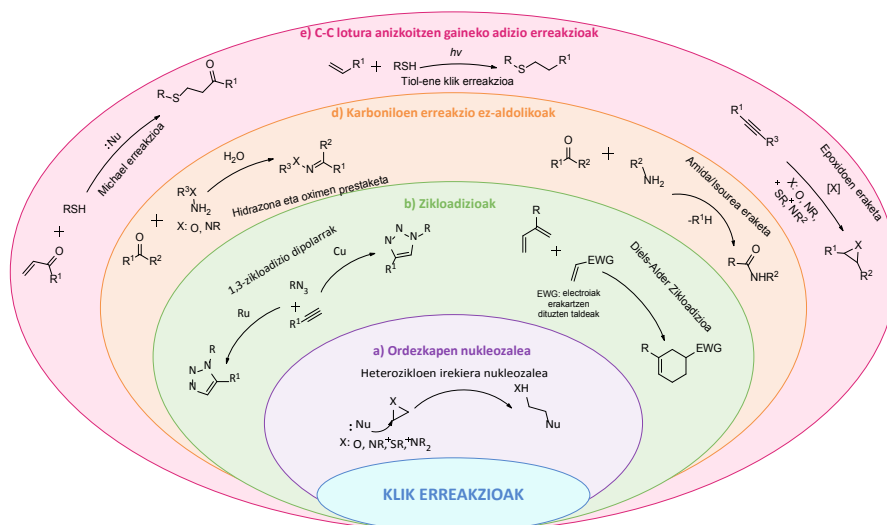
Artikulu honetan, iazko Kimikako Nobel saria jaso zuten hiru ikertzaile bikain horien ekarpenak deskribatu nahi ditugu, ekarpen horiei esker sari zientifiko ospetsuenetariko bat lortu baitute. Ordena kronologikoari jarraituz, klik kimika sortu zenetik, gaur egungo eremu desberdinetan, hala nola materialen 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]:

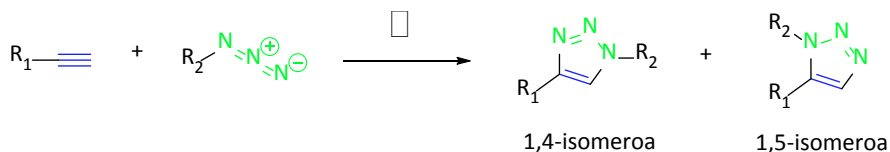
- a) ikuspuntu esperimental batetik erraza izatea, eskuragarriak diren erreaktiboetatik abiatuz [17];
- b) talde funtzional ugarien aurrean tolerantzia izatea [18];
- c) oso selektiboa [18] eta erregioespezifikoa izatea [19];
- d) produktua etekin kuantitatiboekin lortzea [14, 17];
- e) oxigenoarekiko edo urarekiko sentikorra ez izatea [14];
- f) 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 prestateta [21]. C-C lotura anizkoitzen gaineko adizio erreakzioak beste talde batean daude Sharplesen sailkapenean. Talde honetan adibide asko daukagu, 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 dipolarrek izanik [25].



2. irudia. Sharplessen klik erreakzioen sailkapena.

Aipatutako baldintzak betetzen dituzten erreakzio guztien artean, aziden eta alkinoen arteko 1,3-zikloadizio dipolarra klik erreakzio moduan sailkatutako barruan prototipo gisa ezarri da. Erreakzio hau Huisgenek 1960an lehen aldiz deskribatu zuen, eta 1,2,3-triazolak sintetizatzen biderik eraginkorrena 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 ekmolarrean[26].

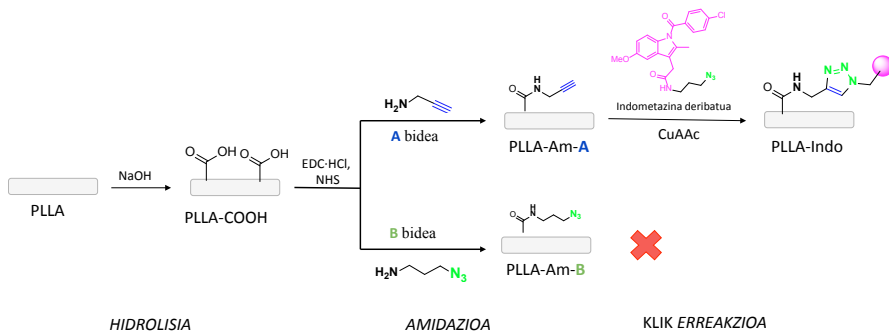


1. eskema. Azida eta alkinoaren arteko Huisgenen erreakzioa.

Erreakzio horren eragin nabarmena ez zen iritsi iazko Kimikako Nobel sarituetako bik ekarpen bana egin zuten arte. Izan ere, 2002an, Meldal-ek eta haren laguntzaileek 1,2,3-triazolen sintesia deskribatu zuten, CuI eta DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) erabiliz disolbatzaile organiko desberdinetan [19]. Handik gutxira, Sharplessen ikerkuntza taldeak kobren (II) sulfato pentahidratoaren eta sodio askorbatoaren erabilera deskribatu zuen

heteroziklo berdinak sintetizatzeko [27]. Bi ikertzaile-taldeek, bakoitzak bere aldetik, kobrezko katalizatzaile bat erabiltzeak erreakzioaren abiadura izugarri areagotzen zuela deskribatu zuten, zeren eta lortu baitzuten abiadura-erreakzioa 10^7 aldiz handiagoa izatea. 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 izenez ere ezagutua, oso erabilia izan da hainbat eremutan [15, 25, 28].

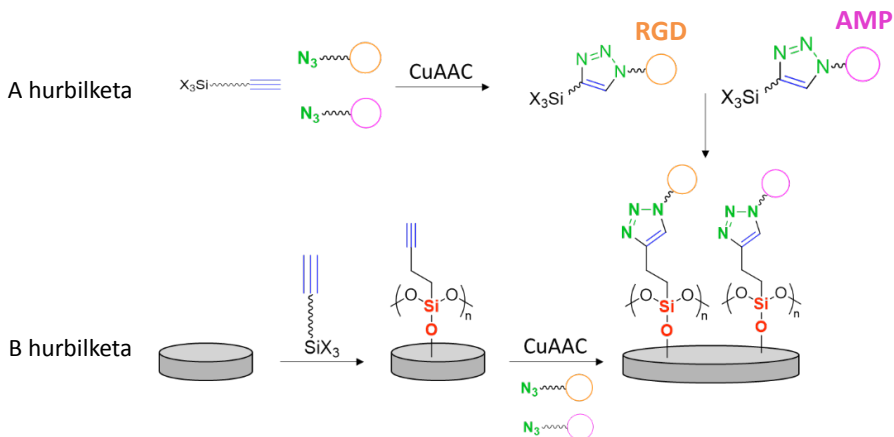
Gainazalen kimikari dagokionez, CuAAC erreakzioa hainbat aktibitate biologiko dituzten molekulak gainazal metaliko edo polimerikoen gainean itsasteko erabili da. Testuinguru horretan, gure ikerketa-taldean egindako lana aipatu beharrekoa da, aktibitate antiinflamatorioa duen indometazina farmakoaren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



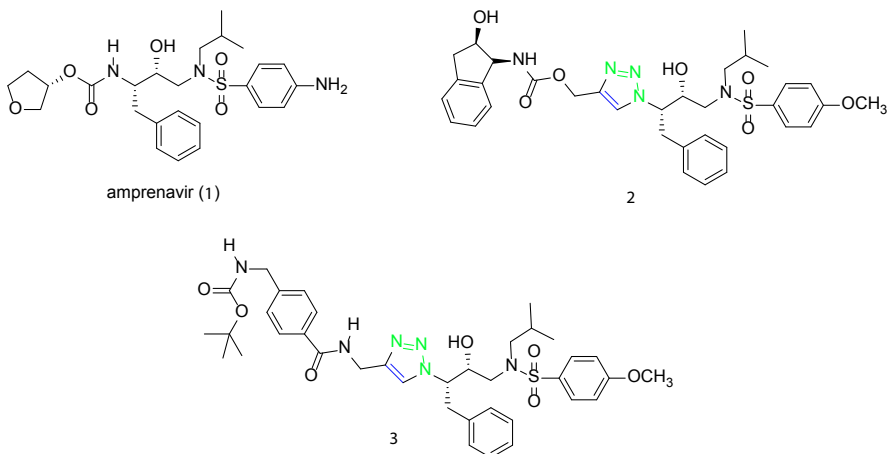
2. eskema. Indometazina antiinflamatorioaren biokonjugazioa CuAACren bidez aurrez eraldatutako PLLA filmaren gainean.

Lin-ek eta haren 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 burutzea zen. Alabaina, egile ber-bererek 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 sililatua alde aurretik metalaren gainazalarekin erreakzionarazi zen, eta, ondoren, kobreakon presentzian, klik erreakzioa gauzatu zen (3. eskema, B hurbilketa) [30, 31].

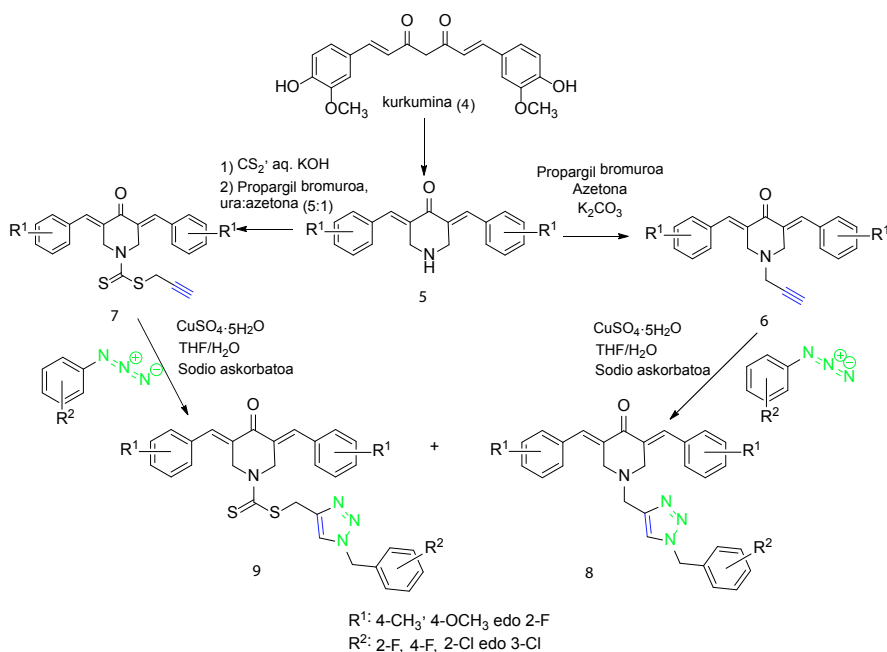


3. eskema. Titaniozko gainazalaren gaineko bi peptidoren biokonjugazioa CuAAC erreakzioaren bidez.



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

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-ek eta haren 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, egiaztatu zuten 1,2,3-triazola lotura peptidikoaren isostero bikaina dela konposatu hauetan [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.

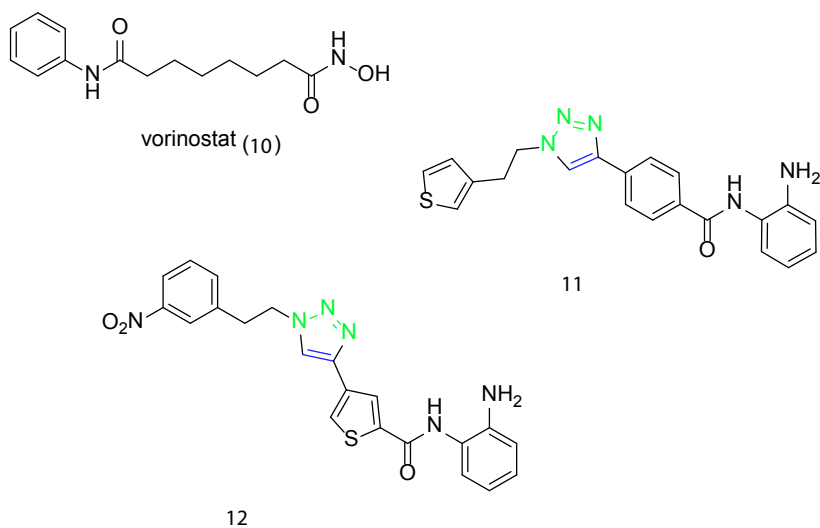


4. eskema. Kurkuminaren **8** eta **9** deribatuen prestaketa.

Mandalapu-k eta haren 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 minbiziaren zelulen (PC-3 eta CU-145) aurka. Halaber, **9** konposatu honek bular minbiziaren zelulen aurkako jarduera ere baduela erakutsi zuten SAR analisiek, eta $IC_{50} = 6 \mu M$ emaitzak lortu ziren MCF-7 zeluletan, $IC_{50} = 6 \mu M$ MDA-MB-231 zeluletan eta $IC_{50} = 6 \mu M$ 4T1 zeluletan [34].

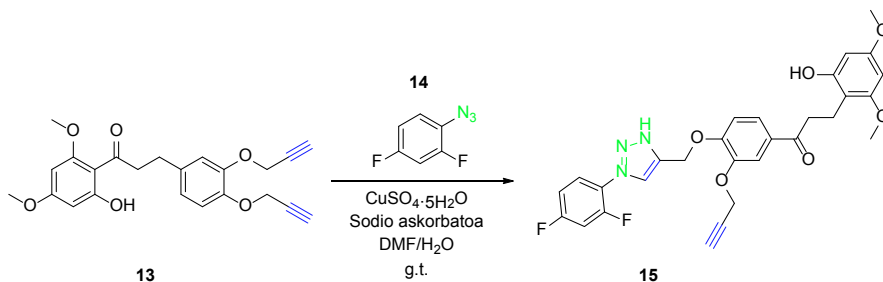
Beste adibide bat, Suzuki-k eta haren kolaboratzaileek aurkeztu zuten. Izan ere, ikertzaile hauek histona desazetilasa 3-ren (HDAC3) kontrako inhibitzaile selektiboak eta eraginkorrak diren bi konposatu eratu zituzten, **11** eta **12**, hain zuzen ere (4. irudia). Konposatu hauek sintetizatzen CuAAC 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

tuak 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 jarduera hobea duela ikusi da. Izan ere, kalkonatik eta flabonatik deribatutako konposatuek bakterioen aurkako aktibitate oso ona erakutsi dute farmako desberdinekin konparatuz [36].



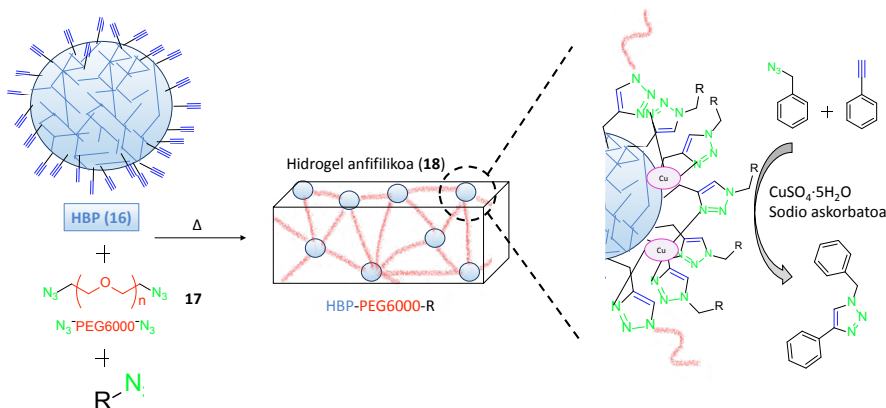
5. eskema. Bakterioen aurkako aktibitatea duen konposatuaren prestakuntza azida-alkino klik erreakzioaren bidez.

Beraz, kobrez katalizaturiko klik erreakzioaren bidez kimika medikoan balizko aplikazioa duten konposatu ugari eratu daitezke, erreakzio honen propietateei esker, hala nola zinetika azkarra, etekin kuantitatiboak, azpi-produktuen 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 hidrogelatan, zeinek gelifikazio prozesuaren eta sareraren parametroaren konbertsioa aurreratzeko erraztasuna erakusten baitute. Horren adibide bat glizimidil azida (GAP) polimeroa da, CuAAC klik erreakzioaren bidez gurutzatu zena. Erreakzio honetan, azida taldeak *bis*-propargil sukzinatuarekin (BPS) erreakzionatu zuen. Triazol-hodiaren deskonposizio exotermikoa (418 kJ/mol) azidarena (317 kJ/mol) baino bero-entalpia altuagoa izateak eta GAP-triazolaren propietate mekaniko hobegoak izateak, aldeztu aurretik prestatutako GAP uretano-sistema baino propultsore hobea bihurtzen du[37]. Beste lan batean, gurutzatze fenolikoak dituzten epoxi termoeonkorrak azida-ino klik

erreakzioaren bidez lortu ziren [38]. Horretarako, propargilatorekin eraldaturiko fenol formaldehido erretxina, novolac izenez ezagutua, eta *bis* azido hidroxi propileter bisfenol A sintetizatu eta gurutzatu ziren klik erreakzioaren bidez, termikoki itzulgarriak diren epoxi novolac erretxinak lortuz. Gurutzaketa erreakzioa katalizatzaile gabe 130 °C-an ematen da, baina Cu₂I₂ katalizatzaile gisa erabilia, tenperatura jaisten da 74 °C-ra [39]. Halaber, adar anitz eta talde azetilenikoak dituen polifenilenoa (hbPPh) molekula txikia den 1,3,5-*tris*(azidometil)bentzenoarekin (TAMB) gurutzatzen da, film bat sortuz, termikoki edo fotokimikoki [40].

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



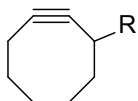
6. eskema. Anfililikoak diren HBP hidrogelen (18) prestakuntza eta eratutako triazol eraztunen konplexazioa kobre ioiekin azida-alkino klik erreakzioetan katalizatzaile gisa erabiltzeko.

3. KIMIKA BIO-ORTOGONALA. 3. SARITUA

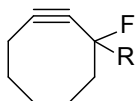
2003. urtean, Carolyn Bertozzik erreakzioak sistema biologikoe-tan burutzeko jakinguran, «kimika bio-ortogonal» termino berria sortu zuen [42]. Erreakzio bio-ortogonalak sistema zelularretan ematen diren erreakzio oso selektiboak dira. Izan ere, erreakzio hauetan parte hartzen duten osagaiek ez dute elkarrekintzarik ezta albo erreakziorik sortu behar ingurune biologikoan dauden beste substantziekin [43-45]. Gogoan izan behar da sistema biologikoak, hau da, zelulak, ingurune urtsuak dira, 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 biologikoe-kiko erreakzioak saihestuz. Gainera, erreakzio horiek ingurune urtsuan burutu behar dira presio eta tenperatura altuak behar izan gabe. Beste aldetik, erreakzio honetan parte hartzen duten erreaktiboak ezin dira ez oxigenoa-rekiko ez zelularen ingurune erreduzitzailearekiko sentikorrak izan behar. Jakina, erabilitako konposatuak eta sortutako produktuak ez dira zitotoxi-koak izan behar [43,46].

Aurreko atalean aipaturiko azida eta alkinoen arteko 1,3-zikloadi-zio dipolar klik erreakzioak baldintza horiek guztiak betetzen ditu, bat izan ezik. Izan ere, katalizatzaile moduan erabiltzen diren kobrearen ga-tzek zitotoxizitatea erakusten dute eta eragina dute zelulen metabolis-moan [47]. Hona hemen 2022. urteko Nobel saria jaso duen emakumea-ren ekarpenik garrantzitsuena. Bertozzik, azidek, 1,3 dipolarofilo ahulak direnak, 1,3 zikloadizio dipolarretan parte har zezaten giro-tenperatu-ran eta katalizatzaile gabe, arrazoizko abiadurekin, alkinoak aktibatu behar zirela proposatu zuen. Horretarako, hau da, alkinoen erreaktibi-tatea bizkortzeko, Bertozzik eta haren kolaboratzaileek 1960an deskribatutako Wittig eta Krebsen alkeno eta alkino tentsionatuei buruzko lan klasikoetan oinarritu ziren [2]. Autore horien arabera, ziklooktinoak, oktino zikliko egonkor txikiak, fenilazidarekin erreakzionatzen zuen «ez-tanda-abiadura» produktu bakarra emanez, triazola, hain zuzen [48]. Izan ere, zikloalkinoak duen eraztunaren tentsioak zikloalkino eta azi-daren arteko erreakzioa azkarra eta espontanea izatea ahalbidetzen du. Oktino ziklikoaren (OKT) **19** angelua oktino linealaren angeluarekin al-deratuz, 163° eta 180° , hurrenez hurren [49], 18 kcal/mol inguruko eraz-tun-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 erreakzioa-abiadura azkartzeko ordezkatzaille gisa elektroierakarleak dituzten ziklooktinoak erabiltzen dira [50, 51]. Esaterako, fluor talde fun-tzionalarekin mono- eta di-ordezkatutako ziklooktinoak (MOFO **20** eta DIFO **21**) erabiltzean, abiadura ordena bikoiztea edota 10 aldiz areago-

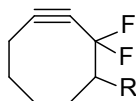
tzea lortu da [52]. Azken urteetan, dibentzooktino konposatuak (DIBO), **22**, arrakasta ugari izan dute erreakzio abiadura izugarri handiagotzen dutelako (5. irudia) [53, 54]. Hala ere, dibentzooktinoaren deribatu horiek sintetizatzea nahiko zaila eta garestia izaten da.



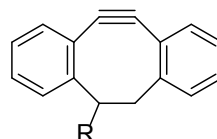
OKT **19**



MOFO **20**



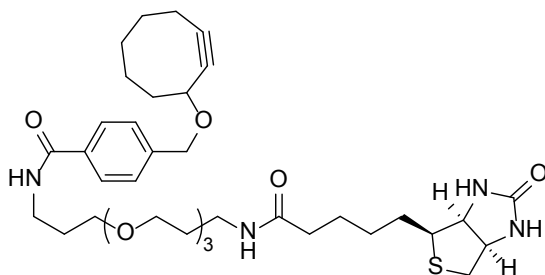
DIFO **21**



DIBO **22**

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

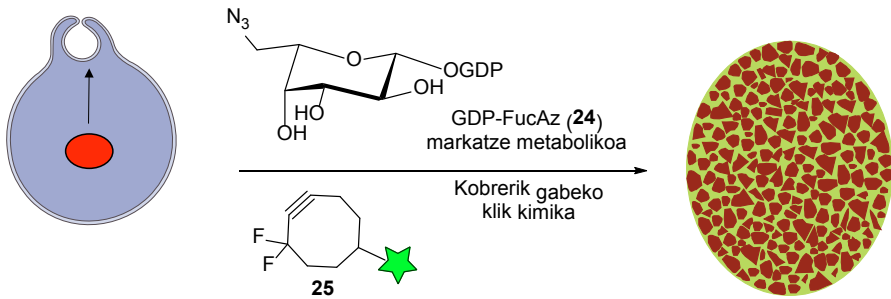
Izan ere, Bertozzik eta haren laguntzaileek biotinatik eratorritako ordezkatu gabeko zikloktinoa **23** (6. irudia) prestatu zuten, eta azida desberdinekin erreakzionarazi zuten baldintza fisiologikoetan, kasu guztietan bi triazol erregioisomeroen nahasketa ekimolekularrak lortuz [55].



23

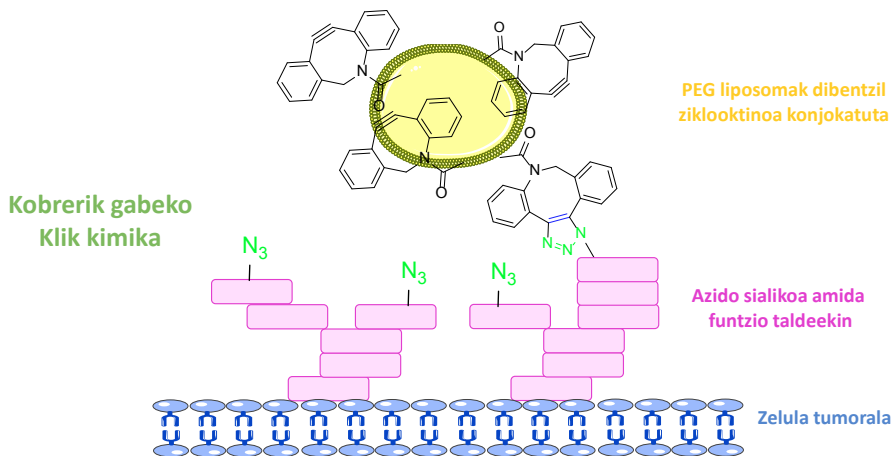
6. irudia. Bertozzik eta haren laguntzaileek biotinatik eratorritako prestatutako zikloktinoaren **23** egitura.

Are gehiago, haren ikerketaren hurrengo urratsa erreakzio hori biomolekulen markatze kobalenterako erabiltzea izan zen, zelula biziak erabiliz (7. eskema). Bertozzi eta haren kolaboratzaileak, erreakzioa burutzerakoan, ohartu ziren ez zela zelula-kalterik gertatzen [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 zikloktino sonda **25** erabili zuten [56].



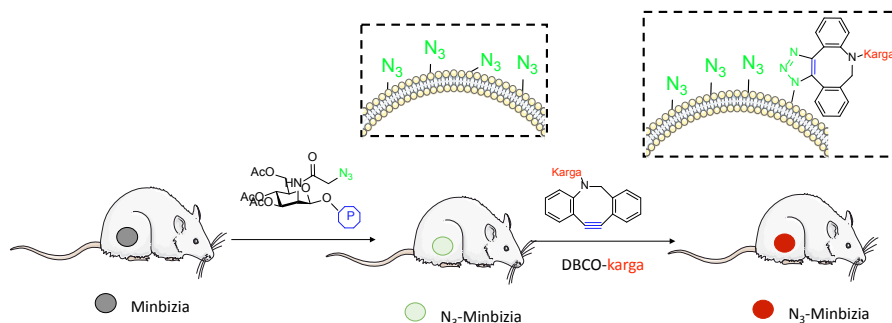
7. eskema. Azida taldea duten fukosa analogoen **24** sartzea zebra-arrain enbrioietan eta azida talde hauen detekzioa kobrerik gabeko azida-ino klik kimika erabiliz.

Kobrerik gabeko klik erreakzioak beste aplikazio batzuk izan ditu eremu biologikoan. Esate baterako, minbiziaren kontrako farmakoek daramatzen nanopartikulak selektiboki minbizian metatzeko estrategia bezala. Izan ere, bere egitura 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].



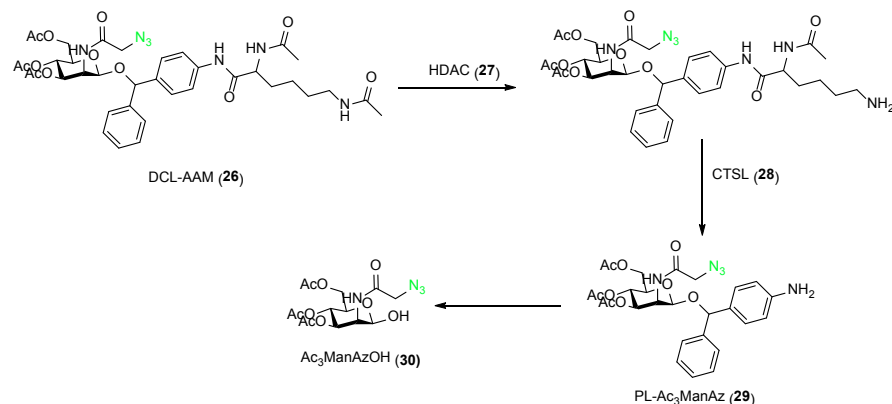
7. irudia. Nanopartikulen *in vivo* estrategia diana tumoralaren aurka kobrerik gabeko klik erreakzio bio-ortogonalaren bidez.

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



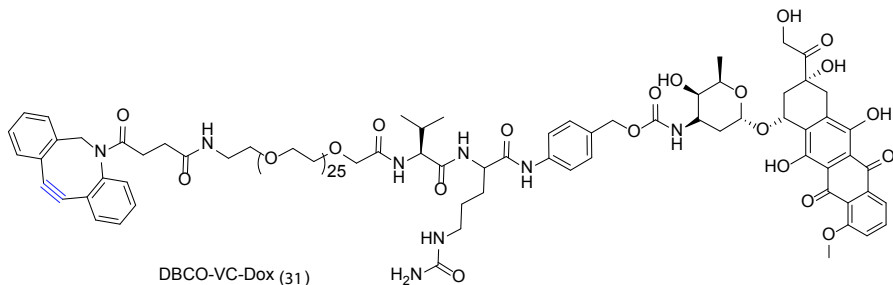
8. irudia. Klik kimikan oinarritutako ehunen segmentazio aktiboa (ATTACK).

Tumore-zelulen markatze espezifikoa 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 berrantolatu 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, dibentzoziklootino taldea (DBCO)-doxorribizina(DOX) profarmakoa (DBCO-VC-Dox) (**31**) (9. irudia) azida funtzio taldez inguratutako zelula mintzera konjugatu zen kimika bio-ortogonalaren bidez. Ondoren, B katepsinak parte harturiko hidrolisi entzimatiakoaren menpe jarriz, DOX aktiboa askatu zen. DCL-AAM eta DBCO-VC-Dox arteko formulazioak tumorearen hazkundera inhibitzen duela ikusi zen, eta modu horretan, 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.



9. eskema. **34** erradiomarkatzailearen prestaketa kobrerik gabeko klik erreakzioaren bidez.

Horren ondoren, kobrerik gabeko azida-alkinoen 1,3-zikloadizio dipolarra beste hainbat aplikaziotarako erabili izan da. Esate baterako, Hausner-ek eta haren kolaboratzaileek klik erreakzioa $\alpha_v\beta_6$ integrinaren erradiomarkatzerako ere erabil zitekeela ikusi zuten (9. eskema) [60]. Hau da, **34** konposatua deformazioak bultzaturiko ziklootinoaren (**32**) eta funtzionali-

zaturiko azidaren (**33**) klik erreakzio baten bidez sintetizatu zen, % 99 purutasunarekin. Gainera, lotura zelularreko esperimenterak zuten markaturiko [¹⁸F]FBA-C6-ADIBON3-PEG7-A20FMDV peptidoak (**34**) afinitate eta espezifikitate ona erakusten duela $\alpha_v\beta_6$ adierazten duten zelulekiko [33]. Halaber, biodistribuzio *in vivo* eta PET analisisiek demostratu dute erradioaktibitatea azkar eliminatzen dela odoretik eta ehun guztietatik. Beraz, esan daiteke klik kimika erreakzio erabilgarria eta erraza dela minbizira bideraturiko peptidoen markatzea egiteko[15].

4. ONDORIOAK

2022. urteko Kimikako Nobel Saria Morten Meldalek, Karl B. Sharplessek eta Carolyn R. Bertozzik jaso zuten, lehengo biek klik kimika sortzeagatik eta azkenak erreakzio bio-ortogonalak garatzeagatik. Aipatu beharra dago erreakzio horri esker erabilera desberdinetarako produktuak modu azkar, sinple 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 medikuntzan, 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 han gertatzen diren prozesuak hobeto ulertzen lagundu du, eta gaixotasunen tratamenduen eta diagnostiko-agenten eraginkorrako eta selektiboagoen garapenean ekarpen nabarmena izan du. Beraz, erreakzio hauen potentziala dela eta, oso baliagarri bihurtu dira hainbat konposaturen eraikuntzan. Hala ere, metodologia hauen aplikazioa ez da amaierara iritsi, erreakzio hauetan oinarrituz aurrerapen gehiago egingo baitira.

5. ESKER ONAK

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

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., HOTH, 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., HERNÁNDEZ-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., SCHAUBENBURG, 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 Dibenzozacyclooctynes by a Decomplexation Method for Dibenzofused 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 $\alpha\beta6$ -specific peptide labeled with [18F] fluorine by copper-free , strain-promoted click chemistry». *Nuclear Medicine and Biology*, **40**, 233-239.

