

CLICK CHEMISTRY

varianti e applicazioni

Chimica bio-ortogonale

La chimica bio-ortogonale è possibile con azidi e alchini perché essi NON sono presenti nei sistemi naturali, per cui li posso inserire artificialmente (ad es. in una cellula o addirittura in un organismo) ed essere certo che la formazione del triazolo, se avverrà, sarà dovuta esclusivamente alla reazione tra i due componenti che ho inserito (azide ed alchino) e non da altri componenti naturali che possono aver dato «interferenza».

Pertanto se utilizzo un azide o un alchino legato ad un «reporter» (cioè molecola di cui si può «determinare la presenza» agevolmente), ad es. marcata con elemento radioattivo oppure fluorescente, allora potrò effettuare una «marcatura», cioè visualizzare nel sistema biologico che voglio studiare dove si trova il triazolo neofformatosi, e quindi dove si sono andati a trovare l'alchino e l'azide che ho inserito artificialmente.

APPLICAZIONI di CHIMICA BIO-ORTOGONALE (labelling di biomolecole)

La click chemistry tra azidi e alchini ben si presta alla chimica bioortogonale perché:

1. È una reazione molto selettiva tra azidi ed alchini che non sono normalmente presenti in natura
2. Non subisce interferenza da altri gruppi organici naturali (ad es. che si trovano in proteine, DNA, ecc.)
3. Avviene in acqua (ma anche varie miscele di acqua con DMSO, alcool, soluzioni tampone, acetonitrile, ecc. - è molto versatile)
4. È poco sensibile al pH (è molto versatile)
5. La reazione avviene a temperatura ambiente
6. La reazione è veloce e pressoché quantitativa

Quindi sarebbe biocompatibile, ma il rame dà tossicità per cui si è dovuta sviluppare una variante con un altro meccanismo per la catalisi che la renda davvero biocompatibile anche all'interno di esseri viventi.

La Prof. Bertozzi ha sviluppato la variante SPAAC biocompatibile



+



?

Carolyn Bertozzi received her A.B. in Chemistry, summa cum laude, from Harvard University in 1988, holding a Radcliffe Science Research Fellowship in 1987. It was at Harvard that she established rock-star status by singing and playing keyboards in a heavy metal band named Bored of Education with Tom Morello (Rage Against the Machine).



La Prof. Bertozzi ha sviluppato la variante SPAAC biocompatibile

Come vedrete nel **video** (vedi risorse Moodle2) la Prof. Bertozzi in primis ha capito che l'azide era un gruppo funzionale ideale per sviluppare la chimica bio-ortogonale, in quanto le azidi NON sono normalmente presenti in natura e le azidi ORGANICHE ($R-N_3$) sono poco reattive, e reagiscono solo in condizioni molto ben specifiche (come in presenza di $Cu(I)$ e alchini terminali $RC\equiv CH$).

All'inizio ha sviluppato la ligazione di Staudinger, in cui l'azide reagisce con una fosfina. Poi questa reazione non era efficiente in vivo, per cui ha sviluppato la SPAAC.

I GENERAZIONE. Ligazione di Staudinger

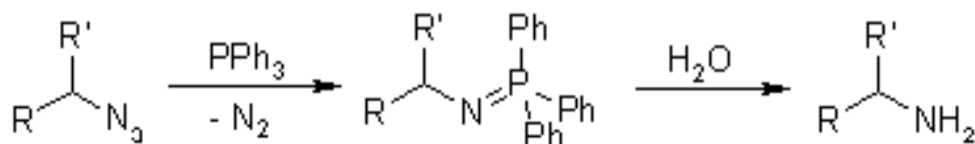
II GENERAZIONE. SPAAC

1. STAUDINGER LIGATION - origin

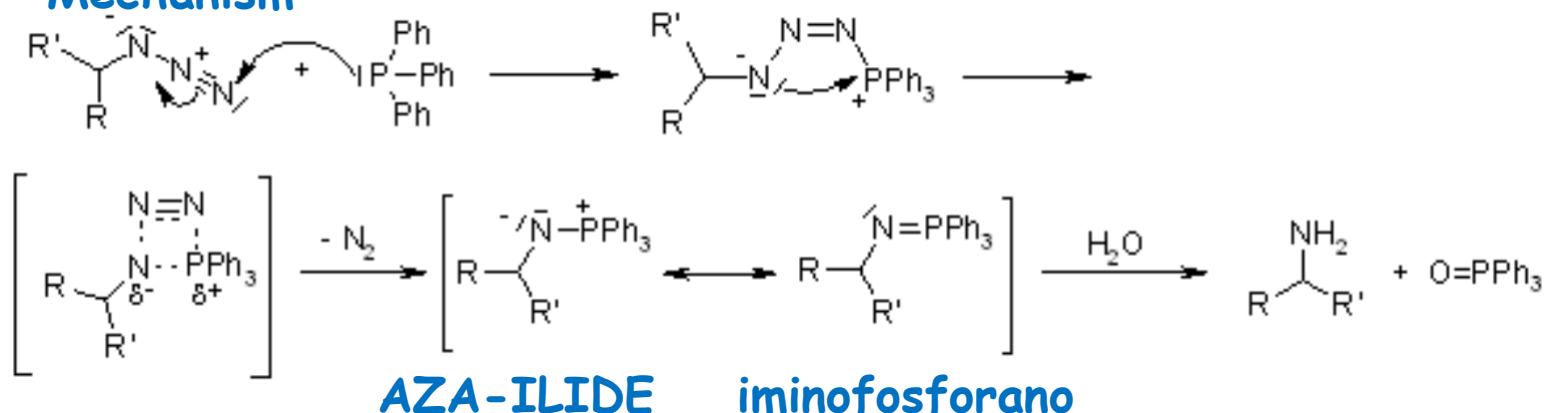
Come vedrete nel **video** (vedi risorse Moodle2) cercando un gruppo funzionale che reagisse in modo efficiente con un'azide organica in una reazione click, il gruppo della Prof. Bertozzi si è imbattuta nella reazione o RIDUZIONE di Staudinger:

Staudinger Reaction

Staudinger Reduction

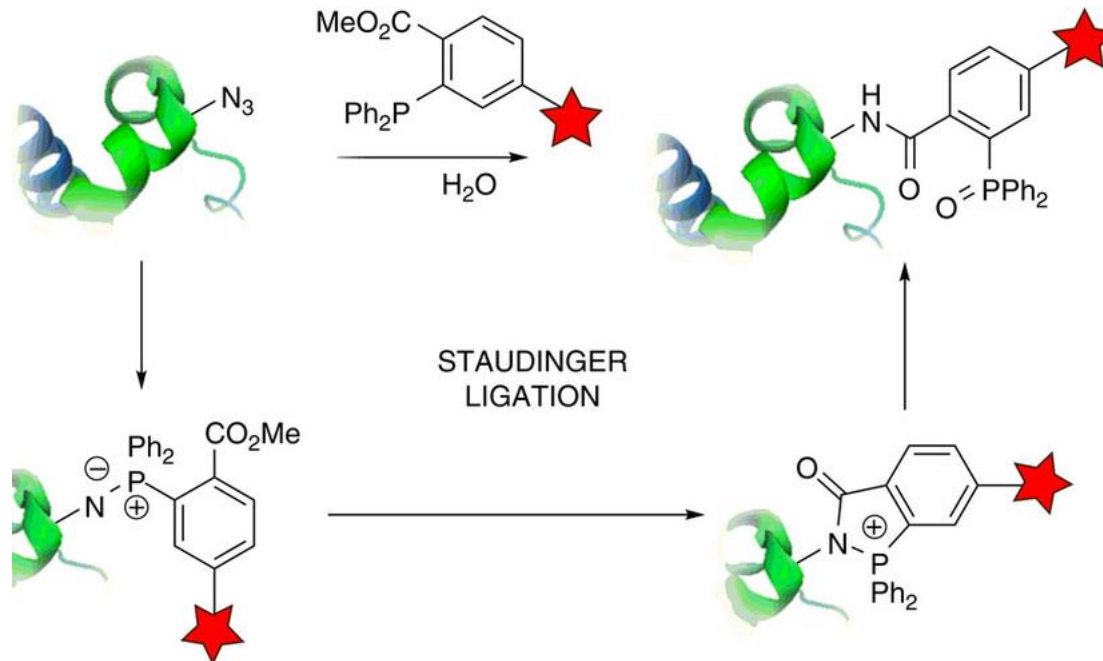


Mechanism



1. STAUDINGER LIGATION - origin

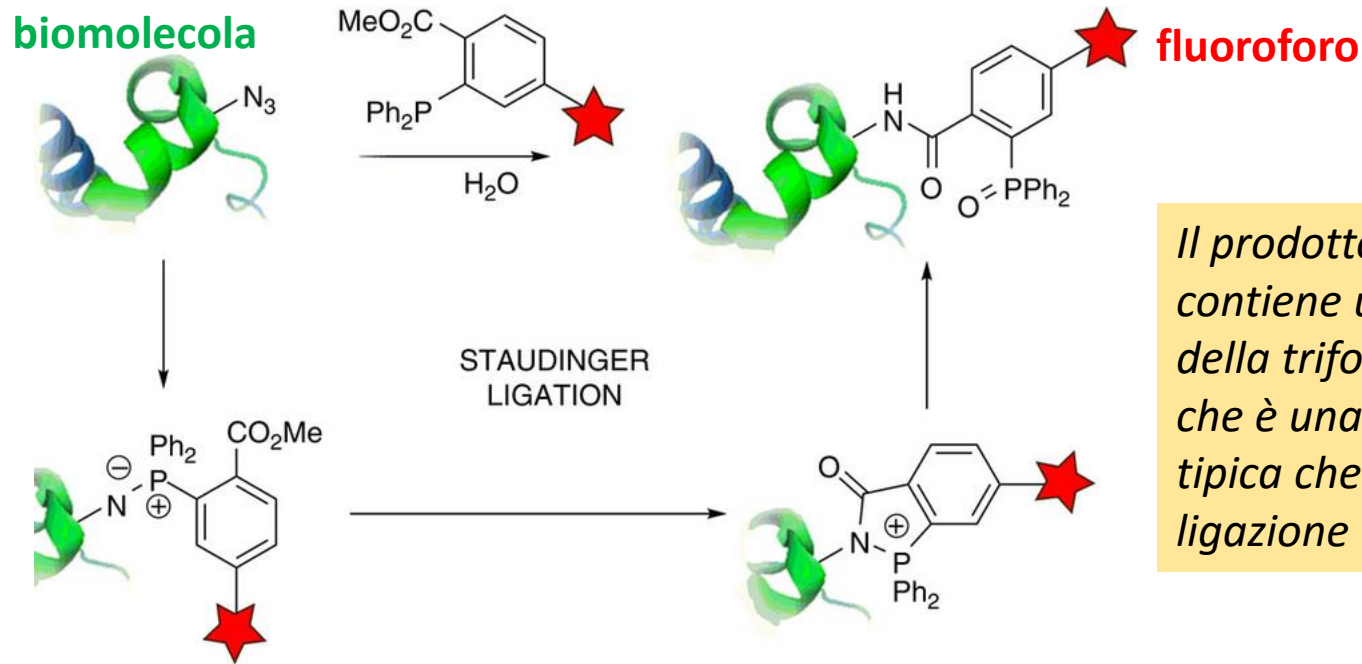
Modificando la trifenilfosfina la reazione è stata trasformata in una ligazione, in cui i due reagenti alla fine sono legati covalentemente tra loro. Ciò è molto utile nelle reazioni bio-ortogonali nel caso in cui 1 reagente sia legato ad una biomolecola che si vuole studiare (ad es. glicoproteina) e l'altro ad una molecola reporter (es. fluoroforo) cioè che si può «vedere» per tracciare la reazione.



1. STAUDINGER LIGATION

Come funziona? Basta aggiungere un ESTERE in orto alla fosfina che «intercetti» l'azoto.

La prima parte del meccanismo è identica alla Reazione di Staudinger. Una volta formata l'**AZA-ILIDE**, l'azoto fa un attacco nucleofilo intramolecolare sul carbonile dell'estere, che perde MeOH come gruppo uscente. Segue l'idrolisi del legame N-P come nella reazione di Staudinger, ma a questo punto ormai le due molecole sono «legate» tra loro.



Il prodotto finale contiene un derivato della trifosfina-ossido, che è una «traccia» tipica che è avvenuta la ligazione di Staudinger.

1. STAUDINGER LIGATION - versione traceless

Poiché nella reazione c'è un gruppo uscente che viene «perso», se non voglio avere la fosfina nella molecola finale, basta invertire il gruppo funzionale «estereo» (cioè con l'O legato al fenile dal lato della fosfina). In questo modo il fosfin-ossido viene perso come «gruppo uscente» nella reazione.

La biomolecola con l'azide alla fine sarà legata alla parte della molecola che aveva la fosfina che si trova dal lato del carbonile. Quindi se voglio legarla ad un fluoroforo dovrò metter il fluoroforo da quel lato. Il prodotto presenterà un «ammide» e quindi non lascerà «traccia» evidente che è avvenuta la ligazione di Staudinger.



Spicer, C. & Davis, B. Nat. Commun 2014, 5, 4740.

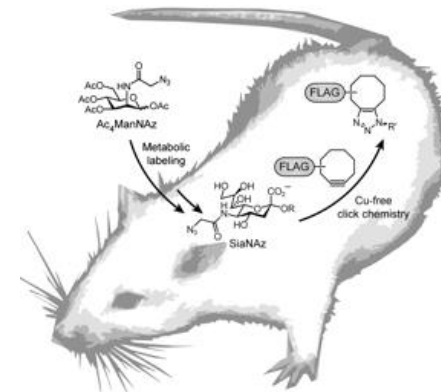
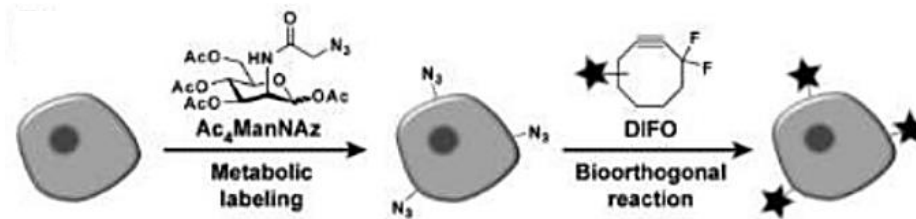
2. SPAAC = Strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition

Questa variante copper-free (cioè senza il rame) sfrutta un **alchino interno ciclico (cicloottino)** il quale soffre di tensione d'anello, che in pratica fornisce l'energia per promuovere la reazione.

La SPAAC sviluppata dalla Prof. Bertozzi è stata usata soprattutto per studiare le glicoproteine, le quali si trovano sulla superficie di tutte le cellule e sono responsabili del loro «comportamento sociale» (cioè del riconoscimento tra cellule che è anche alla base delle risposte immunitarie).

Per esempio, per la SPAAC si può utilizzare un derivato di un carboidrato, monosaccaride mannosio, contenente un azide. Esso viene acetilato in modo da essere sufficientemente idrofobico da attraversare le membrane cellulari e quindi da poter essere internalizzato dalle cellule. Le cellule lo inseriranno nella porzione glicosidica delle glicoproteine e quindi lo esporranno sulla loro superficie. Aggiungendo poi un cicloottino (alchino) fluorescente, posso quindi formare il triazolo su queste glicoproteine non-naturali ed andare a visualizzare dove si trovano sulle cellule.

Questo meccanismo può essere molto utile per valutare ad esempio il processo di biosintesi di glicoproteine in cellule sane e in cellule tumorali, per andare a valutarne le differenze e sviluppare terapie adeguate.



Click Chemistry come chimica BIO-ORTOGONALE

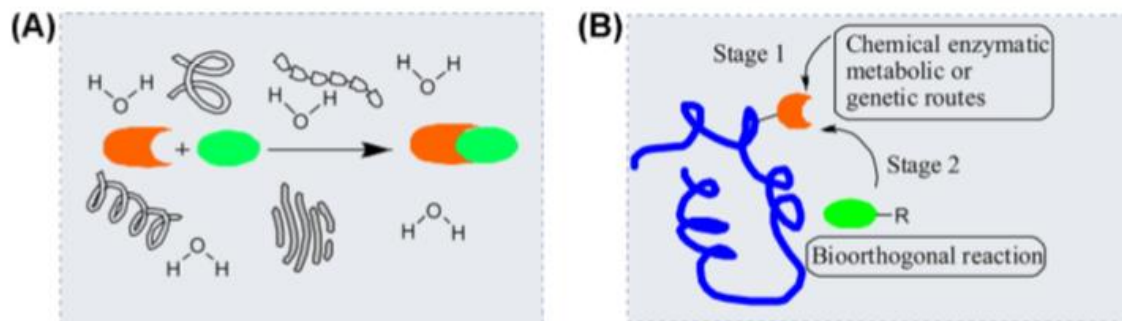
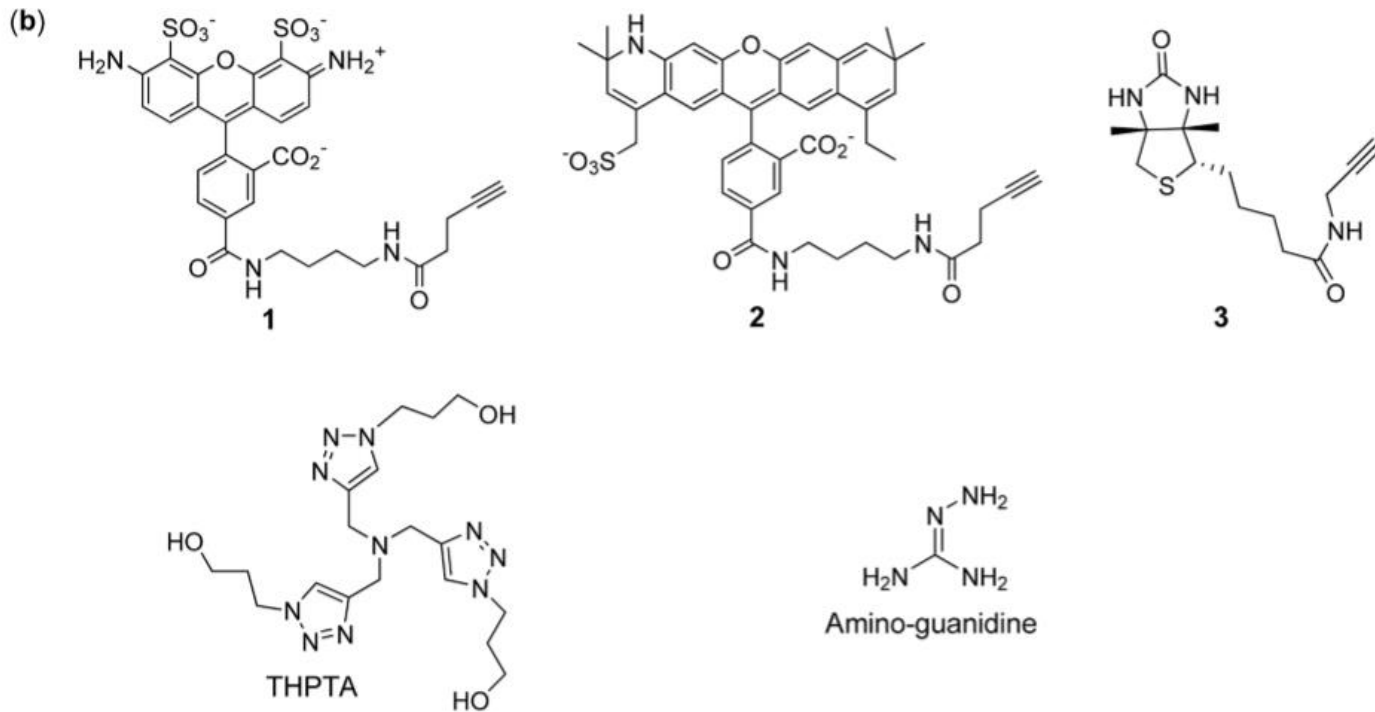
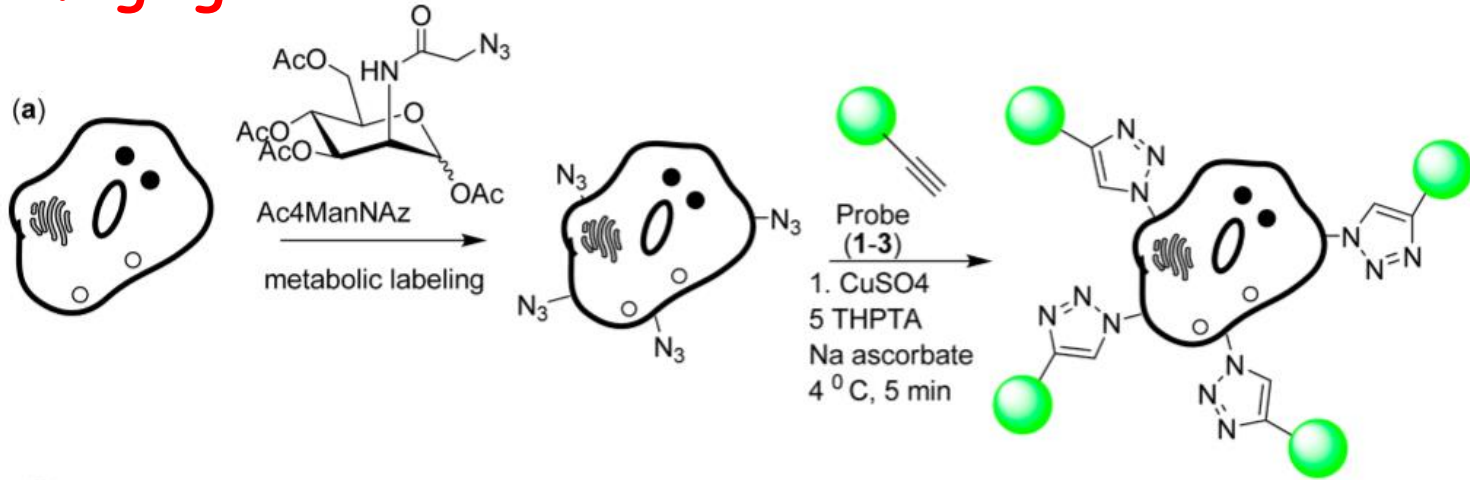


Figure 37. (A) Bioorthogonal reactions: full selectivity and inert to surrounding functionality. (B) Bioconjugation employing bioorthogonal chemistry.



Figure 39. Strategies for labeling biomolecules with chemical reporters in vitro and in vivo. (Clockwise from top left) Enzymes that are catalytically active can be specifically labeled with activity-based probes bearing chemical reporters. Proteins can be labeled with a chemical reporter by enzymatic modification of a short peptide sequence. Individual amino acids within proteins can be replaced, either in a site-specific or residue-specific manner, with unnatural amino acids bearing chemical reporters. Glycans can be metabolically labeled with chemical reporters using unnatural monosaccharide precursors. Lipids can be metabolically labeled with chemical reporters using unnatural lipids.

Cell imaging



«Cu-free» Click Chemistry: Strain-promoted SPAAC

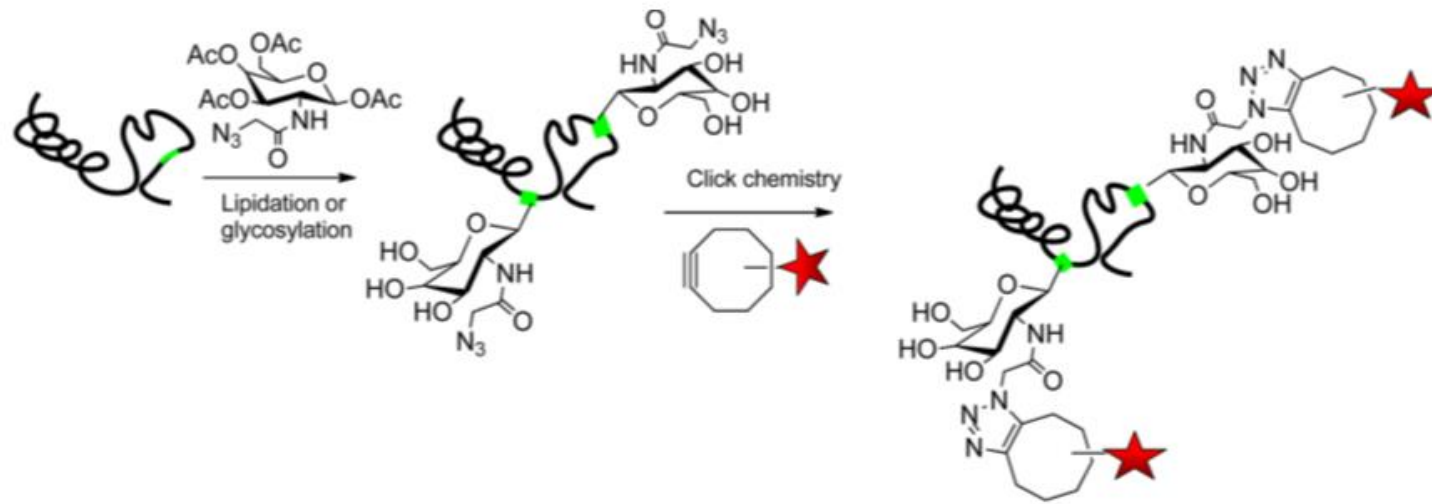
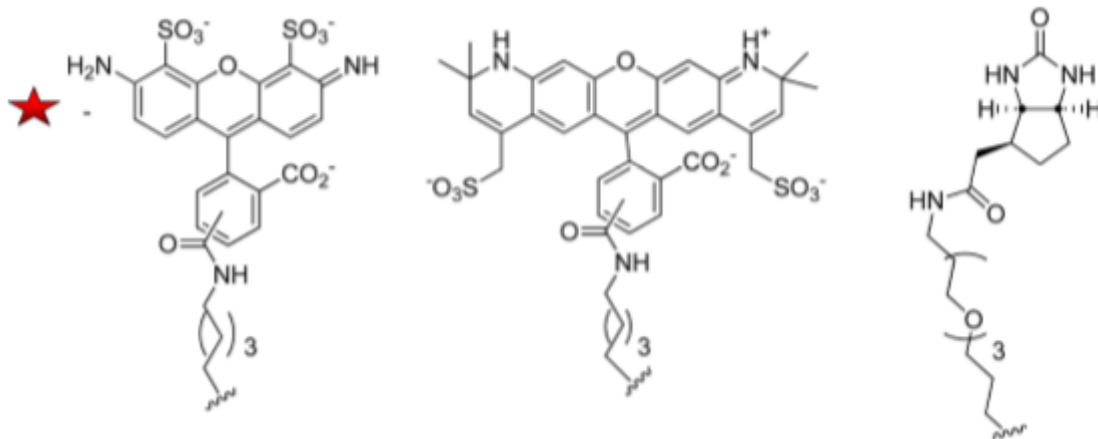


Figure 58. Post-translational incorporation of noncanonical lipids and glycans using click chemistry for monitoring glycans on cells, on tissues, and on zebrafish embryos surface.



Fluorofori
oppure
Biotina

(vitamina riconosciuta
con altissima affinità
dalla proteina
streptavidina, avidina,
o neutravidina)

«Cu-free» Click Chemistry

Applicazioni anche *in vivo*

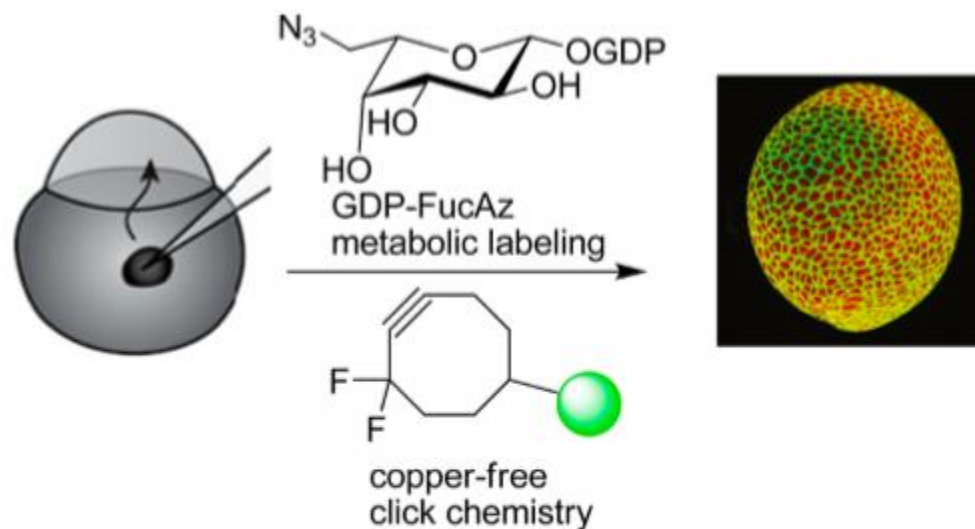


Figure 64. Microinjection of GDP-FucAz followed by copper-free click chemistry enables imaging of fucosylated glycans during the first 5 days of development. Zebrafish embryos were microinjected with vehicle alone (top) or 75 pmol of GDP-FucAz (bottom), allowed to develop, then treated with DIFO-488, and imaged at the time indicated.