



## REAZIONI BIOORTOGONALI: LA CHIMICA APPLICATA AI SISTEMI VIVENTI

**Le reazioni bioortogonali tra gruppi chimici complementari non presenti in ambienti biologici hanno destato un crescente interesse per il loro possibile utilizzo in vivo. L'evoluzione di questo approccio ne ha consentito l'impiego in vari organismi viventi, evidenziando le potenzialità della chimica bioortogonale per applicazioni diagnostiche e terapeutiche nell'uomo.**

### Dalla Click Chemistry alle reazioni bioortogonali

Come già riferito sul n. 6/2022 di questa rivista [1], il premio Nobel per la Chimica 2022 ha premiato la Click Chemistry, l'approccio metodologico sviluppato da K.B. Sharpless e M. Meldal, che consente in modo semplice ed efficace la connessione di piccoli gruppi reattivi per la sintesi di composti chimici più complessi. Questa reazione catalizzata dal rame (I), nota inizialmente come "copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)", permette la sintesi di 1,2,3-triazoli 1,4-disostituiti in maniera altamente regiospecifica, con alte rese ed ottima efficienza (Fig. 1a). L'elevata efficacia di questa reazione ne ha fatto negli anni una metodica standard per l'interconnessione di building blocks eterogenei, rappresentando l'emblema dell'approccio di click chemistry al pun-

to che, ad oggi, la CuAAC ne è un sinonimo [1]. Il grande successo della reazione CuAAC suscitò rapidamente l'interesse scientifico per il suo possibile utilizzo nei sistemi biologici inducendo, agli inizi degli anni 2000, Carolyn R. Bertozzi a definire il concetto di approccio "bioortogonale". Le reazioni bioortogonali sono generalmente processi rapidi e spontanei tra due gruppi chimici complementari, non disponibili in ambienti biologici, in grado di reagire velocemente e selettivamente tra loro attraverso una reazione click, anche *in vivo*, in condizioni fisiologiche di temperatura e pH, senza interferire o essere influenzate da qualsiasi processo biologico circostante [1].

Per la sua efficacia e versatilità, la CuAAC è stata inizialmente impiegata come reazione di click

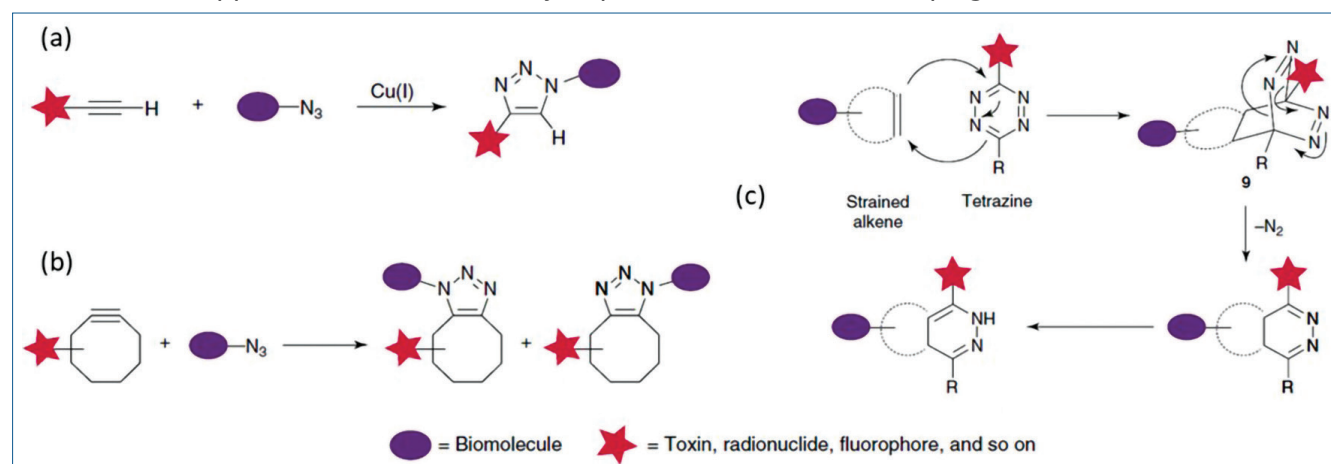


Fig. 1 - Esempi di reazioni bioortogonali. Immagini adattate da [2]



bioortogonale in studi su modelli cellulari. A questo scopo, azidi ed alchini rappresentavano substrati ideali per le reazioni bioortogonali in quanto rari o assenti nelle biomolecole dell'ambiente cellulare.

Tuttavia, l'utilizzo del Cu(I), specie tossica per gli organismi viventi, rappresentava una forte limitazione all'applicazione della CuAAC per indagini in sistemi biologici *in vivo*. Il Cu(I), infatti, può interferire con l'attività di alcuni enzimi o causare tossicità inducendo la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [3]. Per ovviare a questa problematica, i ricercatori svilupparono una serie di ligandi che, coordinando e stabilizzando efficacemente il Cu(I), ne consentissero una più efficiente dissoluzione, promuovendone gli effetti catalitici, così da ridurre la quantità di catalizzatore richiesta e migliorare la biocompatibilità della CuAAC. Tra le varie tipologie di ligandi, quelli che hanno avuto maggior impiego sono state le ammine terziarie sostituite con gruppi alchiltriazolici recanti gruppi ionizzabili polari [2].

### Primi approcci di reazioni bioortogonali *in vivo*: la marcatura dei glicani in zebrafish

Una volta dimostrata la biocompatibilità della reazione Cu(I)-catalizzata in presenza di tali ligandi in colture cellulari di mammifero, questa tecnologia fu in prima battuta impiegata in un approccio di bio-ingegnerizzazione *in vivo* per lo studio dei glicani, componenti cellulari di natura saccaridica con un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici. Come indicato da numerosi studi, alterazioni a carico dei glicconiugati esposti sulla superficie cellulare (ad es. glicoproteine e glicolipidi) sono correlate ad uno stato metabolico anomalo e sono indicative di varie patologie. Di conseguenza, l'applicazione di una strategia bioortogonale di questo tipo per studiare il profilo e il grado di glicosilazione di tali biomolecole in organismi viventi poteva essere di grande aiuto per migliorare la comprensione di determinati processi metabolici e patologici [2].

Sulla base di questo rationale, embrioni di zebrafish sono stati trattati con zuccheri non-naturali, contenenti un gruppo alchिनico terminale, e legati a nucleotidi (ad es. GDP-FucAl). Tali zuccheri modificati, esposti sulla superficie delle cellule degli embrioni

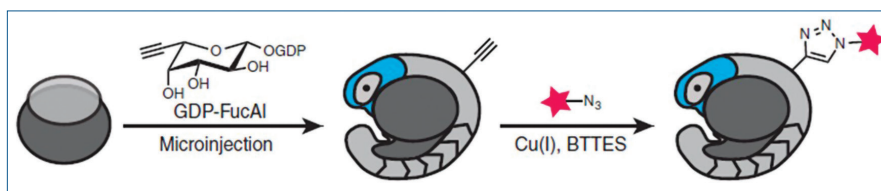


Fig. 2 - CuAAC per la marcatura dei glicani di zebrafish *in vivo*. Immagine adattata da [2]

di zebrafish in via di sviluppo, sono stati successivamente coniugati con un fluoroforo recante funzionalità azidica, consentendo di "etichettare" la componente glicanica di superficie, con una minima tossicità per il sistema vivente (Fig. 2) [4].

### L'evoluzione delle reazioni bioortogonali: dallo zebrafish al topo

Oltre che per la marcatura dei glicani, la click chemistry bioortogonale è stata utilizzata anche per lo studio e il bioimaging di un'ampia gamma di altre biomolecole, come anticorpi, proteine, DNA, RNA, e lipidi. Tuttavia, al netto della dimostrata efficacia in embrioni vivi di zebrafish, la tossicità del rame continuava a limitarne l'uso in sistemi viventi superiori (ad es. nei topi).

Per questo motivo, i ricercatori si concentrarono sullo sviluppo di nuove reazioni/approcci di chimica bioortogonale privi di metalli e con cinetiche di reazione veloci e tali da migliorare l'efficienza dell'etichettatura per consentirne l'impiego in studi *in vivo* [3].

Basandosi su studi ed evidenze riportate a partire dal XX secolo, agli inizi degli anni 2000 la procedura sintetica della "Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC)" venne proposta quale conveniente reazione bioortogonale alternativa. Sfruttando l'elevata reattività di alchini ciclici tensionati con azidi, tale cicloaddizione (3+2) dipolare consentiva l'efficace coniugazione di due porzioni molecolari attraverso la formazione di un gruppo triazolico senza necessità di impiego di un catalizzatore metallico (Fig. 1b). Agli inizi del 2004, C.R. Bertozzi e collaboratori impiegarono derivati cicloottinici altamente tensionati e azidi strutturalmente diversificate in reazioni di SPAAC per studi sia in cellule integre che in animali. L'ottimizzazione di tali reazioni, operata mediante modifiche di natura elettronica e sterica/conformazionale dei reagenti, ha portato allo sviluppo di sistemi cicloottinici in grado di reagire nei confronti di azidi eterogenee con cinetiche di reazione nell'ordine di millisecondi [1-3].

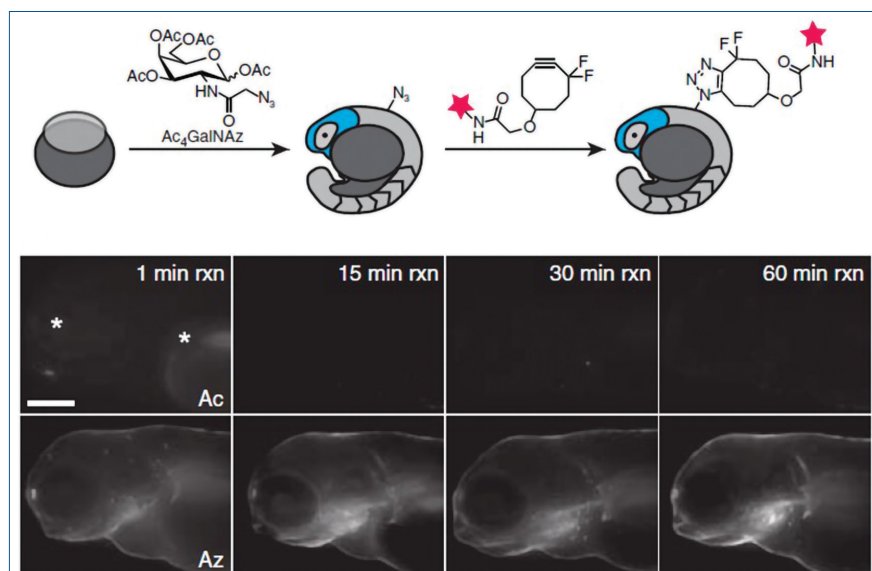


Fig. 3 - SPAAC applicata in zebrafish per l'imaging dei glicani *in vivo*. Immagine adattata da [2]

La prima applicazione della SPAAC in animali aveva preso in considerazione lo studio, mediante bioimaging, di glicani in organismi in fase di sviluppo. Il trattamento di embrioni e larve di zebrafish con una soluzione di un analogo della galattosamina recante funzionalità azidica ( $Ac_4GalNAz$ ), seguito da reazione di cicloaddizione *in vivo* con un sistema cicloottinico funzionalizzato con un fluoroforo (DIFO-Alexa Fluor 647), aveva portato alla significativa e selettiva marcatura metabolica dei residui di GalNAz nei glicani (Fig. 3) [5].

Un passo importante verso il passaggio ad un approccio di diagnostica clinica è stato l'applicazione della chimica bioortogonale in mammiferi come il topo. La chimica bioortogonale ha contribuito, ad esempio, allo sviluppo di un'innovativa metodologia per la visualizzazione/trattamento di masse tumorali in modelli murini, definita di *pre-targeting*. Attraverso questo approccio, un effettore radioattivo viene somministrato solo dopo che il tumore è stato raggiunto selettivamente da un fattore

primario, evitando così la prolungata esposizione a radiazioni dannose. Ad esempio, nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate con un gruppo cicloottinico sono state utilizzate in modelli murini di tumore. Dopo somministrazione e successivo accumulo delle nanoparticelle nella massa tumorale, la somministrazione di derivati azidici funzionalizzati con radionuclidi ha permesso l'attuazione della SPAAC *in situ*, consentendo la rilevazione del tumore tramite la tomografia a emissione di positroni (PET) e dimostrando, infine, l'efficacia di tale approccio bioortogonale per il bioimaging *in vivo* (Fig. 4) [6].

Parallelamente alla crescita degli studi sulla click chemistry, sono state sviluppate una varietà di reazioni alternative da poter impiegare nei sistemi viventi. Tra i vari approcci, il protocollo della *Inverse-Electron-Demand Diels-Alder (IEDDA)*, tra tetrazine e dienofili tensionati (ad es. cicloalcheni e cicloalchini), ha rappresentato un'importante innovazione nel campo della chimica bioortogonale con una possibile applicazione *in vivo*.

Vari studi avevano permesso di evidenziare come fosse possibile migliorare le caratteristiche di reattività e stabilità dei reagenti, nonché la cinetica di reazione, modulando le caratteristiche steriche ed elettroniche dei reagenti impiegati. In tal senso, tetrazine recanti sostituenti elettron-attrattori e dienofili altamente ten-

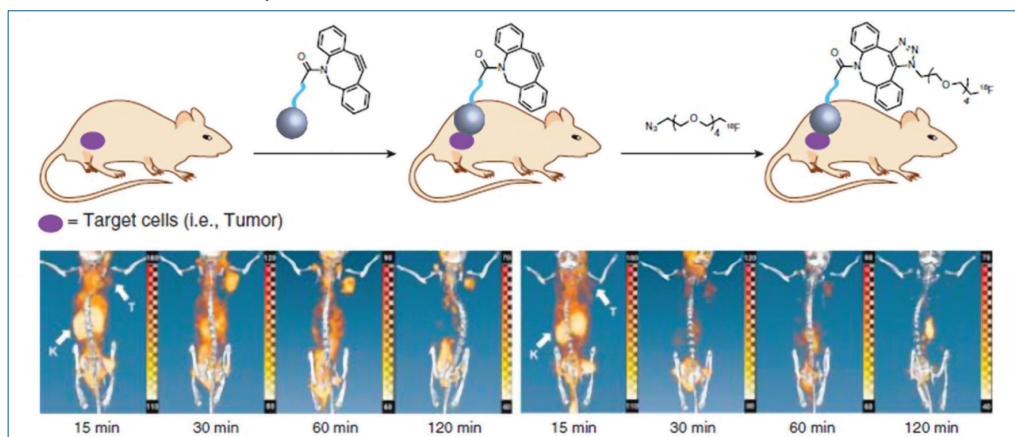


Fig. 4 - Imaging di tumore murino tramite approccio *pre-targeting* e SPAAC *in situ*. Immagine adattata da [2]



sionati, quali *trans*-ciclootenni (TCO), norborneni e ciclopropeni, rappresentavano substrati di elezione per tale approccio biochimico (Fig. 1c) [1]. Rispetto a *CuAAC* e *SPAAC*, queste reazioni presentavano notevoli vantaggi, tali da renderle maggiormente biocompatibili ed idonee per l'applicazione *in vivo*. Infatti, le reazioni *IEDDA* non solo mostravano una cinetica particolarmente veloce, anche in assenza di catalizzatori, ma soprattutto risultavano compatibili con un'ampia gamma di condizioni utili per l'applicazione in sistemi biologici, inclusa la possibilità di poter essere condotte a basse concentrazioni. Inoltre, l'impiego di reagenti, come le tetrazine, corredati da gruppi fluorofori consentiva di ottenere, in seguito a cicloaddizione, diidropiridazine altamente fluorescenti. La giusta combinazione di tetrazine fluorogeniche, capaci di produrre un'elevata fluorescenza solo quando attivate nella reazione di cicloaddizione con opportuni alcheni ciclici tensionati, si era dimostrata particolarmente utile nei casi in cui non risultava semplice eliminare la sonda in eccesso, come in organismi viventi, rendendo così la *IEDDA* un approccio ottimale per condurre studi di bioimaging ed analisi diagnostiche in sistemi viventi.

La maggior parte del lavoro svolto fino ad oggi *in vivo* è stato condotto mediante approccio *pre-targeting* e finalizzato a radioimaging e radio-immunoterapia del cancro. Studi in modelli di tumore in topi hanno dimostrato come lo sviluppo di anticorpi specifici per determinati tipi di tumore funzionalizzati con sistemi TCO potevano, una volta accumulati nel sito di azione, essere coniugati a specifiche tetrazine supportate su polimeri (ad es. destrani) recanti, in aggiunta, radionuclidi o tossine (Fig. 5) [7]. In accordo con tale approccio, la *IEDDA* ha facilitato la creazione di una serie di traccianti marcati con  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  e  $^{177}\text{Lu}$ , per la radiomarcatura di tumori *in vivo* [3].

Questi sforzi iniziali hanno aperto la strada per ottimizzare l'approccio di coniugazione bioortogonale con tetrazina anche per applicazioni cliniche (diagnostiche e/o terapeutiche).

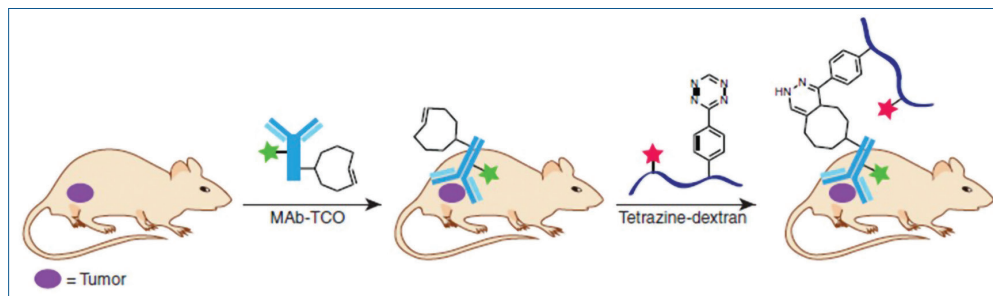


Fig. 5 - Imaging di tumori murini mediante *IEDDA* di addotti (anticorpo-TCO)-(tetrazina-destrani) *in vivo* [2]

### La chimica bioortogonale nell'uomo

Uno dei primi tentativi di applicazione della chimica bioortogonale nell'uomo è stato condotto da ricercatori del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York, mediante lo sviluppo di un nuovo approccio diagnostico basato sul legame di un radioisotopo ad anticorpi attraverso un approccio di click chemistry. I ricercatori hanno somministrato ai pazienti un anticorpo monoclonale (mAb) esprimente una funzionalità *trans*-ciclootennica sulla sua superficie ed avente come bersaglio un antigene presente su di un adenocarcinoma duttale pancreatico. Facendo seguito all'interazione antigene-mAb, la successiva somministrazione di un radioisotopo a base di  $^{64}\text{Cu}$  coniugato a tetrazina ha consentito l'accoppiamento con la porzione *trans*-ciclootennica dell'anticorpo. Il legame risultante ha generato un mAb radiodiagnostico, in grado di identificare la posizione delle cellule tumorali per imaging mediante la tecnica della PET [12].

Alcune piccole aziende del settore, tra cui l'olandese Tagworks, hanno creato un consorzio europeo chiamato "Click-It", che sta sviluppando una più ampia gamma di derivati per la chimica bioortogonale per applicazioni di radioimaging soprattutto nelle terapie antitumorali, mediante impiego di radioisotopi di breve emivita [12].

Su questa scia, in questi ultimi anni sono nate alcune compagnie biotecnologiche per lo sviluppo di coniugati anticorpo-farmaco (ADC) seguendo un approccio bioortogonale, portando l'utilizzo di questa terapia innovativa fino alla fase clinica 1 nell'uomo (Fig. 6).

Nell'ottobre 2020, la biotech californiana Shasqi ha avviato uno studio per un primo uso della chimica bioortogonale nell'uomo, promuovendo uno studio clinico di fase 1 di un profarmaco dell'antitumorale

Name	ADC components	Leading candidates (partner)	Target	Progress (date initiated)
Ambrx	HER2 targeting antibody + Amberstatin269	ARX788	Advanced cancers with HER2 expression	Phase 1 (March 2016)
Catalent/ Redwood Bioscience	Anti-CD22 antibody + maytansine	TRPH-222 (Triphase Accelerator Corp.)	Non-Hodgkin lymphoma	Phase 1 (April 2019)
Sutro Biopharma	Anti-CD74 IgG1 antibody (SP7219) + maytansine	STRO-001	Multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma	Phase 1 (April 2018)
Sutro Biopharma	Anti-FolRa human IgG1 antibody (SP8166) + 3-aminophenyl hemiasterlin	STRO-002	Ovarian and endometrial cancers	Phase 1 (March 2019)
Synaffix	Anti-AXL IgG1 antibody + pyrrolobenzodiazepine dimer SG3199	ADCT-601 (ADC Therapeutics)	Solid tumors with AXL expression	Phase 1 (January 2019)
Syndivia	Undisclosed	SDV1101	Breast cancer, liposarcoma	Preclinical: human trials expected 2021
Tagworks	CC49 fragment + monomethyl auristatin E	TAGW-110	Tumor-associated glycoprotein 72 (TAG72) in various cancers	Preclinical

Fig. 6 - Aziende impegnate nello sviluppo di ADC. Immagine adattata da [12]

doxorubicina recante un gruppo *trans*-cicloottenico (TCO). Il trattamento si basa sulla pre-iniezione di un idrogel modificato con tetrazina nel sito del tumore, seguito da infusioni del profarmaco della doxorubicina. Sfruttando la reazione TCO-tetrazina *in situ*, tale tecnologia consente l'attivazione del profarmaco esclusivamente nel sito tumorale, permettendo di limitare i noti effetti collaterali della doxorubicina (Fig. 7) [12].

### Activity-based Protein Profiling (ABPP): una tecnica efficace per il processo di "drug discovery"

Un'ulteriore applicazione in cui la chimica bioortogonale si è dimostrata utile per studiare processi biologici è rappresentata dalla tecnica del *Activity-based Protein Profiling (ABPP)*. L'ABPP è un metodo per caratterizzare proteine con attività enzimatica attraverso l'utilizzo di sonde molecolari (*activity-based probes, ABP*) caratterizzate dalla presenza di gruppi reattivi elettrofili, che possono reagire con amminoacidi nucleofili presenti nel sito attivo dell'enzima bersaglio. I primi esperimenti a preludio dell'ABPP risalgono agli inizi del 1970 per investigare il meccanismo di azione della penicillina [8]. Da allora ad oggi numerosi studi hanno permesso di evolvere questa tecnica per l'impiego *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo*, permettendo di caratterizzare nuovi target e nuove classi di inibitori [9]. Nel caso

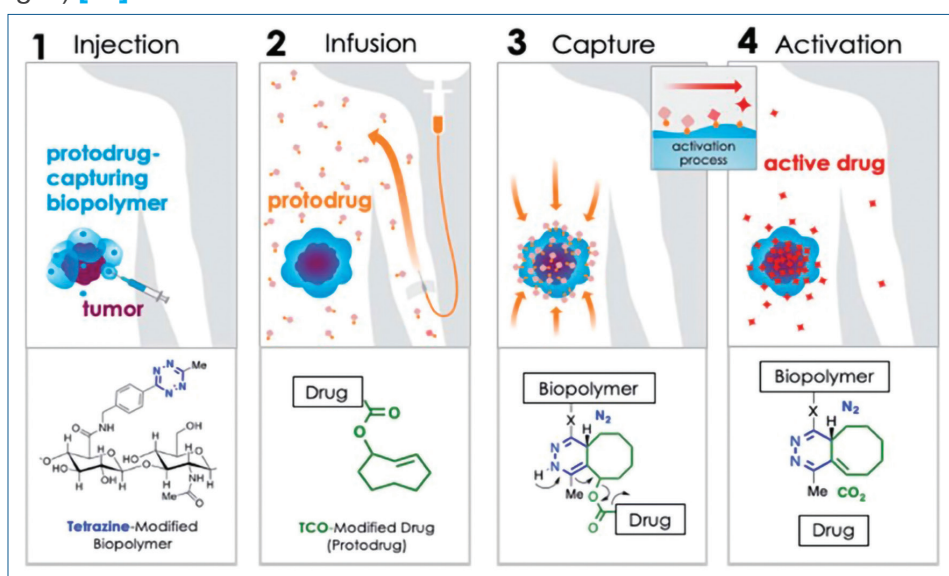


Fig. 7 - Rappresentazione schematica di attivazione di un profarmaco indotto da IEDDA *in situ*. Immagine adattata da [13]

reattivi elettrofili, che possono reagire con amminoacidi nucleofili presenti nel sito attivo dell'enzima bersaglio. I primi esperimenti a preludio dell'ABPP risalgono agli inizi del 1970 per investigare il meccanismo di azione della penicillina [8]. Da allora ad oggi numerosi studi hanno permesso di evolvere questa tecnica per l'impiego *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo*, permettendo di caratterizzare nuovi target e nuove classi di inibitori [9]. Nel caso

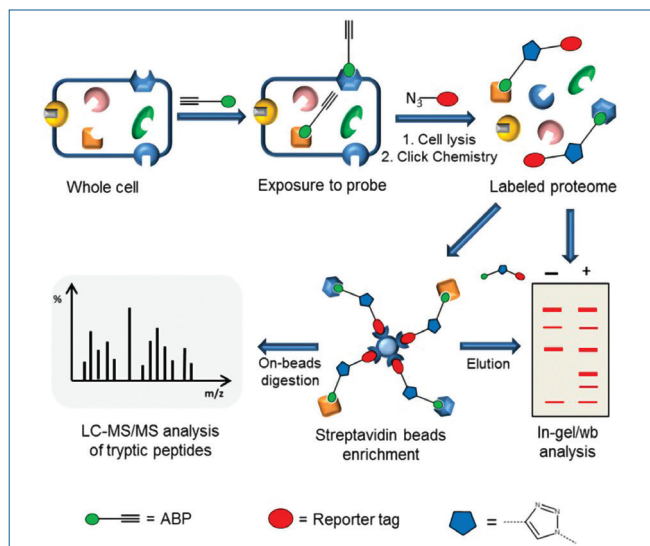


Fig. 8 - Schema esplicativo della tecnica ABPP. Immagine adattata da [11]

dell'ABPP, la chimica bioortogonale viene sfruttata per l'introduzione di molecole fluorescenti, o di reporter per la purificazione, che consentano, rispettivamente, di visualizzare o recuperare gli addotti dei ABP con i propri target. La purificazione degli addotti e la conseguente analisi proteomica possono permettere di identificare i possibili bersagli, noti o meno, e il meccanismo di azione di composti biolo-

gicamente attivi (Fig. 8). Per questa sua caratteristica, l'ABPP rappresenta un'importante integrazione al processo di "drug discovery" per la validazione dei target biologici, la caratterizzazione di composti attivi orfani e gli studi di selettività. Tuttavia, poiché non tutte le classi di composti agiscono attraverso una reazione covalente, un superamento di questo limite è rappresentato dalla tecnica del *photo-affinity labeling* (PAL). Nella PAL la sonda molecolare, oltre alla funzionalizzazione bioortogonale, si caratterizza per la presenza di un gruppo fotoreattivo che, irraggiato con luce di opportuna lunghezza d'onda, può generare un intermedio altamente reattivo in grado di formare legami covalenti con le macromolecole circostanti [10]. La PAL ha permesso quindi di estendere il concetto di "attività" a quello di "affinità" per poter studiare non soltanto interazioni di piccole molecole con enzimi ma anche modelli più complessi di interazione con e tra macromolecole (proteine, DNA, RNA).

### Evoluzione e sviluppo degli approcci di chimica bioortogonale

Per mettere in evidenza gli sviluppi, le diversità di impiego e le tipologie di target biologici delle varie reazioni di click bioortogonali, una ricerca pubblica-

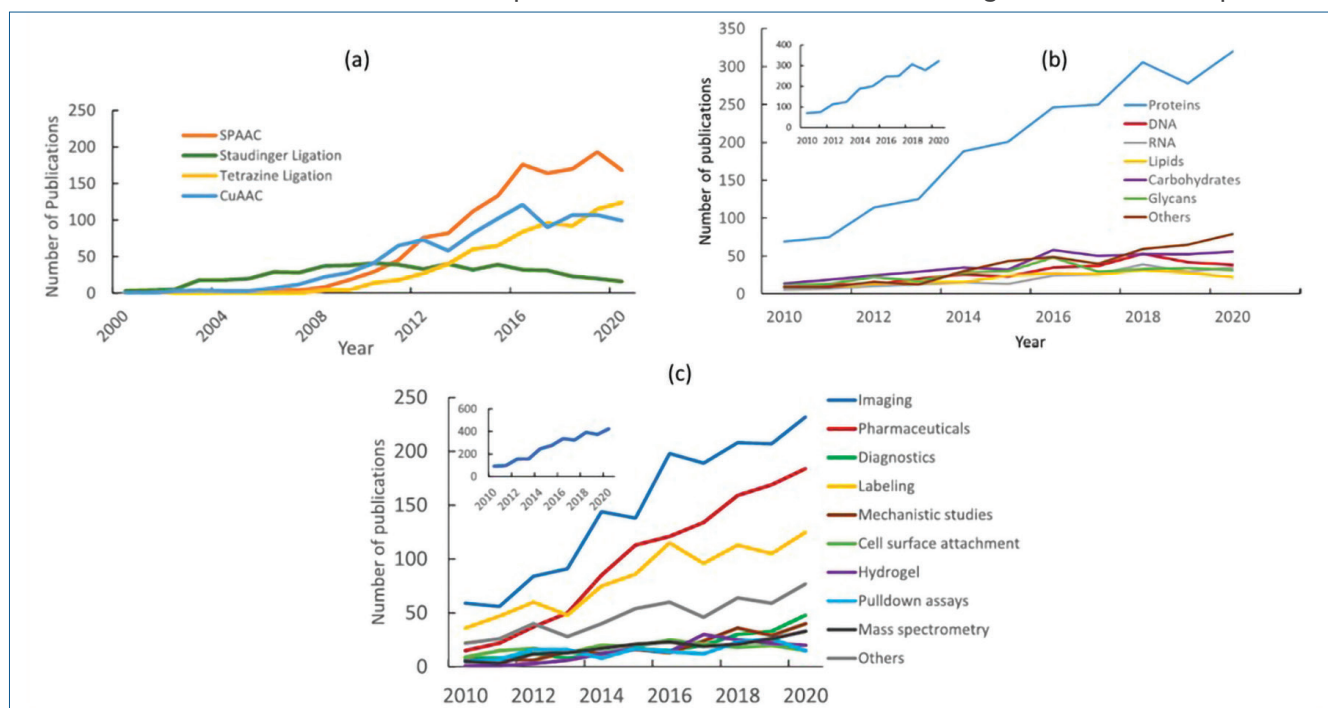


Fig. 9 - Analisi dell'applicazione della chimica bioortogonale nel corso degli anni. Immagini adattate da [14]

ta di recente ha analizzato il CAS Content Collection per evidenziare trend e caratteristiche di questi innovativi approcci nel periodo che va dal 2010 al 2020 (Fig. 9) [14].

Una prima analisi dei numeri delle pubblicazioni inerenti tali reazioni ha mostrato un marcato incremento nel corso degli anni, ma si possono osservare chiaramente tendenze diverse.

Mentre la reazione di Staudinger è risultata progressivamente meno popolare negli ultimi anni, le corrispondenti cicloaddizioni *CuAAC* e *SPAAC* hanno destato un crescente interesse, raggiungendo tuttavia un plateau intorno al 2015. Interessante notare, invece, come il numero di pubblicazioni che riguardano le reazioni con tetrazine (*IEDDA*) è aumentato costantemente, segno di un continuo e progressivo interesse e sviluppo (Fig. 9a).

Diversi sistemi biologici sono stati studiati (*in vitro* ed *in vivo*) attraverso l'incorporazione di un opportuno reagente bioortogonale, tra questi proteine, DNA, RNA, lipidi, carboidrati, glicani e altri. Mentre il numero di pubblicazioni per ogni tipo di biomolecola mostra in genere una crescita costante negli anni 2010-2020, la maggior parte di tali studi e ricerche ha avuto come oggetto il proteoma (Fig. 9b). Questa tendenza può indicare un forte interesse nella ricerca per la chimica bioortogonale correlata alle proteine e potrebbe anche suggerire che metodi per l'incorporazione di funzionalità adatte all'approccio bioortogonale sono stati principalmente sviluppati per lo studio di tali biomolecole.

In termini di potenziale impiego e relative applicazioni dei nuovi approcci della chimica bioortogonale, il numero di pubblicazioni per il periodo sopraccitato ha evidenziato come l'imaging rappresenti il principale campo di interesse, seguito solo dall'utilizzo di tali strategie in ambito farmaceutico (Fig. 9c) [14].

## Conclusioni

Fin dal loro esordio, le reazioni bioortogonali hanno suscitato un grande interesse per il loro possibile utilizzo in sistemi viventi. Sfruttando i principi e la logica alla base della click chemistry, tale approccio ha consentito di esplorare *in situ* processi fisiopatologici in maniera selettiva e non invasiva. L'evoluzione della chimica bioortogonale ne ha consentito l'impiego in vari organismi viventi, aprendo nuovi scenari per l'utilizzo nell'uomo a fini diagnostici e terapeutici. Rappresen-

tando un anello di congiunzione tra chimica e biologia, la chimica bioortogonale si configura come un prezioso strumento interdisciplinare, la cui applicazione in campo biomedico si auspica potrà favorire importanti avanzamenti per la comprensione e la cura di malattie.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Saccoliti, F. Bertozzi, *La Chimica e l'Industria online*, 2022, **104**(6), 10.
- [2] C.G. Gordon, C.R. Bertozzi, *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, 417.
- [3] K.B. Liu, *Trends Chem.*, 2019, **1**, 763.
- [4] D. Soriano del Amo, W. Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 16893.
- [5] S.T. Laughlin, J.M. Baskin *et al.*, *Science*, 2008, **320**, 664.
- [6] S.B. Lee, H.L. Kim *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 10549.
- [7] a) N.K. Devaraj, G.M. Thurber *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, **109**, 4762; b) B. Nichols, Z. Qin *et al.*, *Chem. Comm.*, 2014, **50**, 5215.
- [8] H. Suginaka, P.M. Blumberg, J.L. Strominger, *J. Biol Chem.* 1972, **247**, 5279.
- [9] A.E. Speers, B.F. Cravatt, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 535.
- [10] K. Kozoriz, O. Shkel *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 2023, **56**, 25.
- [11] E. Romeo, S. Ponzano *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**, 2057.
- [12] M. Peplow, *Nat. Biotechnol.*, 2019, **37**, 835.
- [13] K. Wu, N.A. Yee *et al.*, *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 1259.
- [14] R.E. Bird, S.E. Lemmel *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2021, **32**, 2457.

### Bioorthogonal Reactions: the Chemistry Applied to Living Systems

Bioorthogonal reactions between complementary chemical groups not present in biological systems have attracted a growing interest for their possible use *in vivo*. The evolution of this approach has allowed its use in various living organisms, highlighting the potential of bioorthogonal chemistry for diagnostic and therapeutic applications in humans.