

# Hot science

*Chemistry*

eighth edition



# La biotecnología y la química orgánica hacen click

## Química bioortogonal y la reacción SPAAC

Julio César Flores-Reyes  
Eduardo González-Zamora\*

Departamento de Química, Universidad  
Autónoma Metropolitana Unidad  
Iztapalapa.

\*Autor para la correspondencia:  
egz@xanum.uam.mx

### Resumen

La bioconjugación es una técnica empleada para monitorear eventos celulares mediante la modificación química de biomoléculas. Esta modificación no debe interferir con los procesos que ocurren dentro de la célula, es decir, debe ser bioortogonal. Una de las reacciones químicas que ha emergido para la bioconjugación es la reacción click entre azidas y ciclooctinos para producir un triazol. El uso de esta reacción ha permitido el estudio de procesos bioquímicos *in vivo* mediante técnicas de microscopía.

**Palabras clave:** química click, bioconjugación, química bioortogonal.

La modificación química de biomoléculas, o bioconjugación, se ha utilizado desde hace alrededor de 100 años para monitorear eventos celulares, por ejemplo, determinar la actividad enzimática y observar biomarcadores mediante técnicas de microscopía, entre otros. Las proteínas han sido las biomoléculas más estudiadas mediante técnicas de bioconjugación debido al interés en su diversa actividad biológica, y a que están formadas por grandes cadenas de aminoácidos cuyos grupos funcionales pueden utilizarse para realizar modificaciones estructurales mediante reacciones químicas.

Cuando se realizan técnicas de bioconjugación, la elección de las especies químicas que van a participar es de suma importancia ya que para el estudio de cualquier sistema lo mejor es que la perturbación sea mínima. Es aquí donde entra en juego un concepto impor-

tante conocido como química bioortogonal, el cual se refiere a las reacciones químicas que se pueden realizar dentro un sistema biológico sin que interfieran con los procesos bioquímicos, es decir, la química bioortogonal permite el estudio de la estructura y función de las biomoléculas en su ambiente nativo. Para que esto sea posible, las reacciones deben ser rápidas, altamente selectivas y tolerantes a las condiciones biológicas. Esto representa un gran desafío para los químicos orgánicos ya que están acostumbrados a trabajar bajo condiciones extremas en comparación con las condiciones biológicas. Por ejemplo, en un laboratorio de química orgánica es común realizar algunas reacciones a temperaturas tan bajas como  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bajo atmósfera de gas inerte, con disolventes libres de agua y pH altamente ácido o básico, lo cual contrasta con las condiciones biológicas donde el pH debe ser cercano a neutro, la atmósfera puede contener oxígeno, el medio es acuoso y la temperatura debe estar entre  $4$  y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  [1].

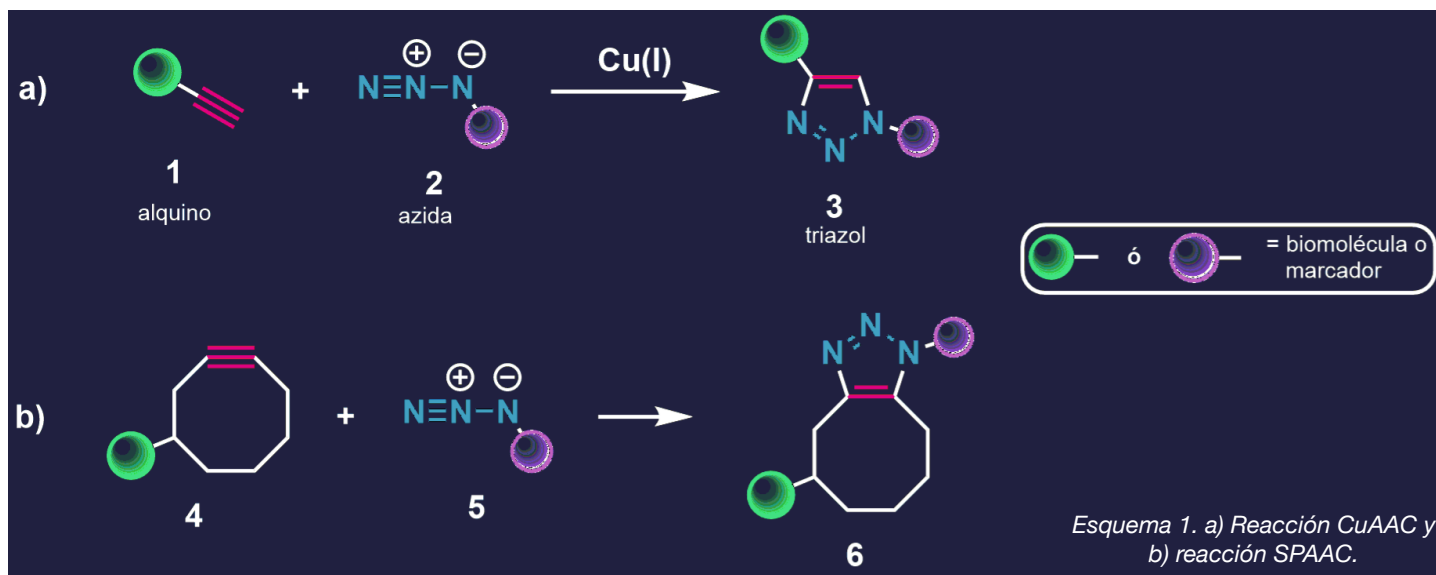
Existen muchas reacciones químicas que se han utilizado para la bioconjugación y continuamente se siguen investigando nuevas reacciones altamente específicas para este fin. Una reacción que se ha popularizado durante los últimos años es la cicloadición catalizada por cobre entre azidas orgánicas y alquinos terminales para formar triazoles, mejor conocida como la reacción click (o CuAAC, por sus siglas en inglés) (Esquema 1 a)). Es importan-

te mencionar que hay muchas reacciones que pertenecen a la química click, y esta se refiere a aquellas reacciones que ocurren fácilmente en un único paso, en general son poco sensibles a las condiciones de reacción y generan irreversiblemente un único producto con alto rendimiento y especificidad. Pensemos en el click que se escucha al abrochar ambos extremos de un cinturón de seguridad para entender por qué se le llamó así a este tipo de reacciones. Entonces, si bien hay muchas reacciones que pertenecen a la química click, la cicloadición de azidas y alquinos es conocida como “la” reacción click prototípica ya que cumple con todas las características mencionadas sobre la química click [2].

Con lo ya mencionado podría pensarse que la reacción click es una candidata ideal para utilizarse para bioconjugación, excepto que para lograr velocidades de reacción aceptables requiere ser catalizada por una fuente de cobre(I) y este es tóxico para muchas de las células microbianas y mamíferas, además de que puede ser desactivado por ligantes con afinidad al cobre que pueden encontrarse dentro de la célula. Aunque es posible realizar esta reacción sin la catálisis, se requieren condiciones que no son compatibles con sistemas biológicos, además de que se pierde la especificidad de la reacción ya que se pueden formar dos isómeros con una conectividad diferente, por lo que prescindir del cobre deja de ser una opción viable.

Para superar este obstáculo se empleó una variante poco conocida de esta reacción en la que el alquino está instalado en un ciclooctino (un anillo de ocho miembros). Un alquino consiste de un enlace triple entre dos átomos de carbono, lo que le confiere una gran rigidez. Sin embargo, cuando se encuentra dentro del ciclooctino este enlace se deforma y se vuelve muy tenso porque no se encuentra en su geometría natural. Esta enorme tensión hace que el alquino sea mucho más reactivo y provee la fuerza motriz necesaria para llevar a cabo la reacción click sin necesidad de catalizadores. A esta reacción se le conoce como cicloadición azida-alquino promovida por tensión o SPAAC por sus siglas en inglés (Esquema 1 b)). Aún con este desarrollo la reacción SPAAC era considerablemente más lenta que la reacción CuAAC, por lo que fue necesario realizar modificaciones al ciclooctino para incrementar la velocidad de reacción. Estas modificaciones consistieron en introducir grupos funcionales que aumentaran aún más la reactividad del alquino para finalmente lograr velocidades de reacción que fueran comparables con las de la CuAAC, y que, de esta forma, la reacción SPAAC se convirtiera en una verdadera reacción click sin la necesidad de la catálisis con cobre [3].

¿Cómo pueden introducirse estos grupos funcionales a una biomolécula? Y ¿qué es más conveniente introducir, la azida o el ciclooctino? En general se prefiere la introducción de





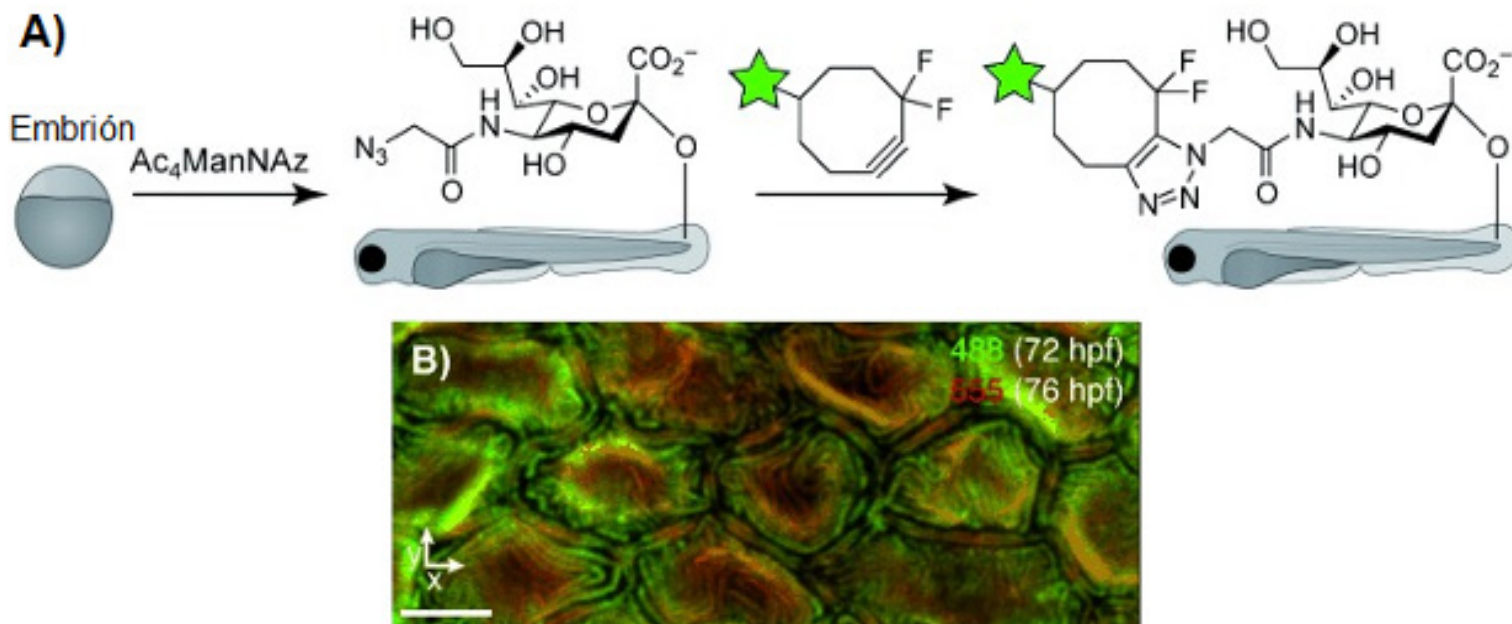


Figura 1. A) Esquema general del etiquetado fluorescente de embriones de pez cebra. B) Fluorescencia en una capa de células en la región ventral de la mandíbula de un embrión de pez cebra, observada tras la reacción SPAAC. Imagen modificada tomada de [5].



Figura 2. De izquierda a derecha: Carolyn R. Bertozzi, Morten Meldal y Karl Barry Sharpless. Imagen tomada de <https://cen.acs.org/people/nobel-prize/Click-bioorthogonal-chemistry-win-2022-Nobel-Prize-in-Chemistry/100/i36>


la azida ya que es un grupo funcional pequeño, inerte y no tóxico para las biomoléculas. Su introducción puede realizarse por métodos enzimáticos, por codificación genética o por bioconjugación, que es el método más simple y directo. Las azidas se derivan de las aminas y, por lo tanto, los aminoácidos de una proteína (generalmente cisteína y lisina) se pueden modificar para introducir este grupo funcional. La

introducción del ciclooctino supone una dificultad mayor ya que es un fragmento voluminoso y su síntesis es compleja, por lo que no pueden utilizarse las mismas estrategias que para las azidas. Sin embargo, esto sí se ha logrado, y conlleva la ventaja de que la azida puede utilizarse para funcionalizar con mayor facilidad muchos tipos distintos de moléculas, por ejemplo, compuestos fluorescentes o para teñir organelos [4].

Un ejemplo importante de la utilidad de la reacción SPAAC para el estudio de organismos in vivo fue publicado en 2012 por un grupo de investigadores liderado por Carolyn R. Bertozzi [5]. En este trabajo estudiaron el sialoma de embriones de pez cebra mediante el etiquetado fluorescente de fragmentos de ácidos siálicos (una clase de monosacáridos) presentes en glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en la superficie celular (Figura 1). El sialoma está presente en todas las células de los organismos vertebrados, y se refiere a la totalidad de biomoléculas, organelos y células que contienen fragmentos de ácidos siálicos; estos compuestos cumplen con funciones de comunicación intrínseca y extrínseca entre células, así como de defensa. En este caso, la azida se introdujo metabólicamente cultivando los embriones de pez cebra en presencia de *N*-azidoacetilmanosamina (Ac4ManNAz), la cual actúa como un precursor biosintético del ácido azido siálico, que es incorporado a los polisacáridos de la superficie celular. Después, los embriones se hicieron reaccionar con un ciclooctino conjugado con un marcador fluorescente, lo cual permitió su visualización mediante microscopía confocal. Este etiquetado fluorescente permitió observar la formación y localización de nuevas zonas que contienen células con polisacáridos en su superficie y monitorearlos durante el desarrollo de los embriones [5].

En conclusión, la reacción SPAAC es una variante de la reacción CuAAC que no necesita de catalizadores de cobre, sino que ocurre debido a la alta tensión de anillo que proviene de la presencia del alquino en un ciclooctino. Lo anterior, junto con las características de la reacción click (alta velocidad y especificidad, tolerancia a diferentes condiciones de reacción) ha permitido que pueda ser utilizada para la bioconjugación, que es la modificación de biomoléculas mediante reacciones químicas. Esto se utiliza para poder estudiar y monitorear procesos que ocurren dentro de células y organismos vivos sin interferir con ellos, a lo que se le ha llamado como química bioortogonal.

Si este tema le pareció mínimamente conocido quizás es porque en 2022 el premio No-

bel de química fue otorgado en conjunto a Carolyn R. Bertozzi, quien desarrolló el concepto de química bioortogonal y la reacción click sin catálisis de cobre, y a Morten Meldal [6a] y Karl Barry Sharpless, [6b] por sus contribuciones independientes al desarrollo de la reacción click catalizada por cobre (Figura 2). 

## Referencias

- [1] Stephanopoulos, N., & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 876-884. <https://doi.org/10.1038/nchembio.720>
- [2] Sletten, E. M., & Bertozzi, C. R. (2009). Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie*, 48(38), 6974-6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>
- [3] 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(46), 15046-15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>
- [4] Van Hest, J. C. M., & Van Delft, F. L. (2011). Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition. *ChemBioChem*, 12, 1309-1312. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100206>
- [5] Dehnert, K., Baskin, J., Laughlin, S., Beahm, B., Naidu, N., Amacher, S., & Bertozzi, C. (2012). Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry. *ChemBioChem*, 13, 353-357. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100649>
- [6a] 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(9), 3057-3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>
- [6b] Rostovtsev, V., Green, L., Fokin, 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(14), 2596-2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)