



Francesco Saccoliti, Fabio Bertozzi

D3-PharmaChemistry, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova
fabio.bertozzi@iit.it

STA TUTTO IN UN “CLICK”: LE RAGIONI DEL PREMIO NOBEL PER LA CHIMICA 2022

Il premio Nobel per la Chimica 2022 celebra la Click Chemistry, l'approccio metodologico sviluppato da K.B. Sharpless e M. Meldal che consente, in modo semplice ed efficace, la connessione di piccole unità per la sintesi di composti chimici più avanzati. C.R. Bertozzi ha applicato questa strategia per lo sviluppo della Chimica Bioortogonale, consentendo lo studio di processi d'interesse bio-farmacologico in sistemi viventi, incentivandone una sua più vasta applicazione interdisciplinare.

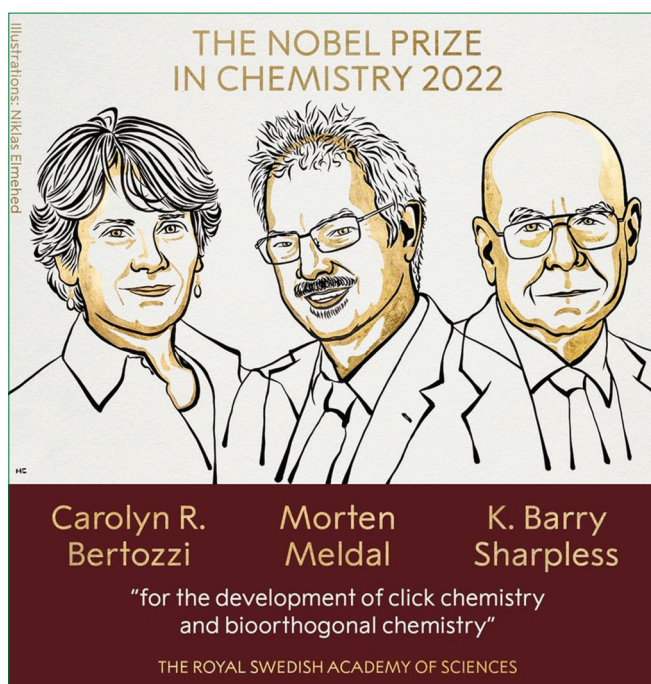


Immagine da <https://www.siliconrepublic.com/innovation/nobel-prize-chemistry-2022-click-sharpless-meldal-bertozzi>

Una nuova visione della sintesi: l'idea della Click Chemistry

Durante il discorso di accettazione del Norris Award per la Chimica Fisica Organica del 1968, George S. Hammond esprime il suo pensiero pragmatico circa la finalità della sintesi organica: “The most

fundamental and lasting objective of synthesis is not production of new compounds, but production of properties”.

Hammond concepiva la sintesi come un potente strumento il cui fine ultimo dovrebbe essere la produzione di composti che, per le loro proprietà, risultano di beneficio per l'uomo. Tuttavia, un pensiero così lungimirante risultava in contrasto con l'approccio sintetico di un periodo storico che, seppur fruttuoso e formativo, ha evidenziato i lunghi e notevoli sforzi richiesti nell'ottenimento, ad esempio, di sostanze organiche naturali.

La chimica farmaceutica, prefiggendosi l'obiettivo di scoprire composti biologicamente attivi utili per la cura dell'uomo, rappresenta certamente un'incarnazione positiva del pensiero di Hammond. Tuttavia, affinché tale disciplina potesse apportare benefici tangibili in tempi e modalità compatibili con le esigenze di salute dell'uomo, si rendeva necessario affrontare le criticità insite nel lungo, e spesso infruttuoso, processo farmaceutico.

Questi aspetti erano ampiamente condivisi da Barry K. Sharpless che, nel lavoro pionieristico del 2001, ribadisce, e difatti cita, il pensiero di Hammond [1]. Avendo come obiettivo primario la “costruzione di proprietà” sfruttabili in vari settori, Sharpless identificava, come fattori limitanti per l'ottenimento di nuovi composti di interesse biofarmacologico,



le lunghe e difficoltose strategie sintetiche, di cui i prodotti naturali rappresentano un consumato esempio. Come spesso succede alle menti argute, Sharpless vedeva nella semplificazione la chiave di volta utile per il raggiungimento più rapido e diretto dell'obiettivo.

Sharpless ammirava la semplice, quanto efficace, strategia che la natura mette in atto nell'assemblare piccoli "mattoni" biosintetici per la costruzione di molecole organiche complesse e, traendone ispirazione, riteneva che l'applicazione di tale logica combinatoriale potesse essere di grande beneficio.

La Click Chemistry: un nuovo paradigma di reazione

Le criticità rilevate indussero Sharpless a proporre il concetto di *click chemistry* quale innovativo approccio sintetico che, puntando su semplicità, efficacia e velocità di processi già noti, si prefigge l'obiettivo di "catalizzare" ed ottimizzare la scoperta di nuovi composti di interesse. Date le difficoltà della sintesi "classica", Sharpless preferiva affidarsi ad un gruppo ristretto di reazioni già messe a punto, la cui facilità ed efficacia ne consentissero la riproduzione sia su piccola che su grande scala per le più svariate applicazioni. La *click chemistry* ambisce a sfruttare questa tipologia di reazioni con lo scopo di connettere selettivamente piccole unità (*building blocks*) mediante legame carbonio-etero-atomo (C-X-C), emulando l'approccio che la natura applica nella biosintesi di polimeri [1]. Nel suo lavoro fondamentale, Sharpless delinea quali sono i requisiti che i nuovi processi sintetici dovrebbero rispettare per essere in linea con l'approccio di *click chemistry*.

Le reazioni devono essere modulari e ad ampio scopo, attuabili secondo condizioni di reazione semplici e tali da consentire l'ottenimento del prodotto desiderato in modo stereospecifico (ma non necessariamente enantioselettivo) ed in alte rese. I relativi prodotti (ed eventuali sottoprodotti) dovrebbero essere facilmente isolabili (o eliminabili) sfruttando metodi non cromatografici, quali cristallizzazione e distillazione.

Le procedure devono essere di semplice esecu-

zione e, idealmente, non dovrebbero subire interferenza da parte di ossigeno e acqua. Inoltre, i reagenti ed i *building blocks* impiegati dovrebbero essere facilmente reperibili ed i prodotti di reazione risultare stabili in condizioni fisiologiche. Le reazioni potrebbero essere condotte in assenza di solvente o in solventi non tossici, inclusa l'acqua, o facilmente rimovibili. I processi sintetici in questione devono essere termodinamicamente favoriti, e con conversione completa, conducendo irreversibilmente e selettivamente ad un unico prodotto [1]. Basandosi su questi principi generali, Sharpless selezionò ed elencò 4 classi di reazioni che, risultavano compatibili con l'approccio di *click chemistry*:

- apertura nucleofila di eterocicli elettrofili tensio-nati (ad es. epossidi e aziridine);
- reazioni non aldoliche di composti carbonilici (ad es. formazione di uree e ammidi);
- addizioni a doppi e tripli legami (ad es. epossidazione e diidrossilazione);
- cicloaddizioni di specie insature (ad es. etero-Diels Alder e cicloaddizioni 1,3-dipolari).

Tra queste iniziali possibilità, le cicloaddizioni 1,3-dipolari tra un'azide ed un alchino emersero subito come reazioni con un ampio margine di sviluppo e un elevato potenziale di diversità strutturale. Sebbene il meccanismo di reazione sia stato chiarito solo successivamente da Huisgen [2], il primo esempio di tale trasformazione risale al 1893 [3], quando A. Michael osservò la formazione del derivato 1,2,3-triazolico per reazione della fenilazide con l'estere dimetilico dell'acido acetilendicarbossilico. Ulteriori esempi di reazioni tra le azidi e sistemi insaturi furono descritti nel corso del secolo successivo, consentendo, infine, ad Huisgen di elucidarne il meccanismo agli inizi degli anni Sessanta [2].

Favorendo la connessione di piccole "unità", la reazione esprimeva al meglio le finalità della *click chemistry* senza, tuttavia, suscitare particolare interesse all'epoca di Huisgen. Tra i motivi della limitata popolarità delle cicloaddizioni il più importante rimaneva la scarsa regioselettività del processo sintetico che, nelle cicloaddizioni di azidi e alchini terminali conducevano alla formazione di una miscela equimolare di triazoli 1,4- e 1,5-disostituiti

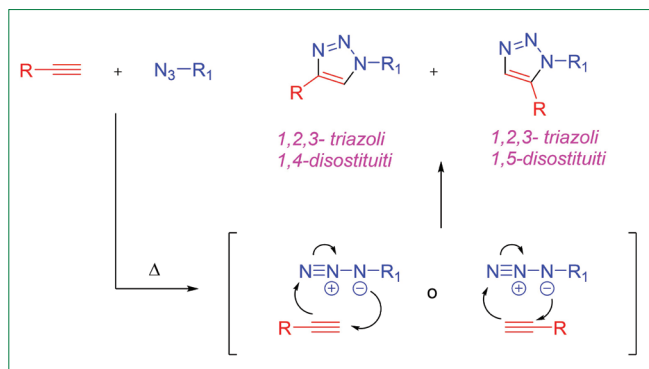


Fig. 1 - Meccanismo e regiochimica delle cicloaddizioni termiche 1,3-dipolari azide-alchino terminale

(Fig. 1). Inoltre, a meno di dipolarofili attivati, caratterizzati da gruppi elettron-attrattori o inclusi in cicli tensionati, la conversione risultava modesta a temperatura ambiente, richiedendo elevate temperature e tempi lunghi per indurne una conversione completa [5].

Sebbene, le azidi, a causa della loro potenziale esplosività, non rappresentassero funzionalità di interesse per i chimici del tempo, Sharpless riteneva tali substrati tra i più interessanti per reazioni di cicloaddizione, in relazione alle loro caratteristiche di reattività e stabilità [1].

La scoperta della “Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition” (CuAAC)

La situazione cambiò drasticamente quando, nel 2001, Morten Meldal and Christian W. Tornøe scoprirono che le reazioni tra un’azide e un alchino terminale possono essere catalizzate dal rame a

temperatura ambiente, conducendo alla formazione regiospecifica, ed in alte rese, dell’isomero triazolico 1,4-disostituito [5].

In maniera indipendente e parallela agli studi di Meldal e Tornøe, Sharpless, Fokin e collaboratori identificarono il rame a basso stato di ossidazione [Cu(I)], quale catalizzatore di questo tipo di reazioni. Il Cu(I), mediante attivazione, coordinazione ed opportuno orientamento delle specie reagenti, porta ad una marcata riduzione dell’energia di attivazione e, di conseguenza, promuove un aumento della velocità di reazione (circa 10^7), nonché la regiospecificità del processo di cicloaddizione (Fig. 2) [5]. In termini di costo e purezza, l’impiego di una combinazione di sali rameici ed un riducente, come il sodio ascorbato, risultava vantaggiosa per generare il catalizzatore rameoso *in situ*. Questa nuova reazione, nota come “copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)”, offriva diversi vantaggi rispetto alle versioni precedentemente sviluppate. Innanzitutto, la sintesi di 1,2,3-triazoli 1,4-disostituiti avviene generalmente in maniera altamente regiospecifica, con alte rese ed ottima efficienza attraverso un processo che risulta, essenzialmente, indipendente da natura, grado e tipo di sostituzione delle specie reagenti. Operativamente, la reazione è molto semplice e può essere condotta a temperatura ambiente ed a diversi pH in vari solventi, inclusi alcoli e acqua senza impiego di co-solventi.

I triazoli sostituiti, quali prodotti della CuAAC, si sono dimostrati intermedi/derivati di grande in-

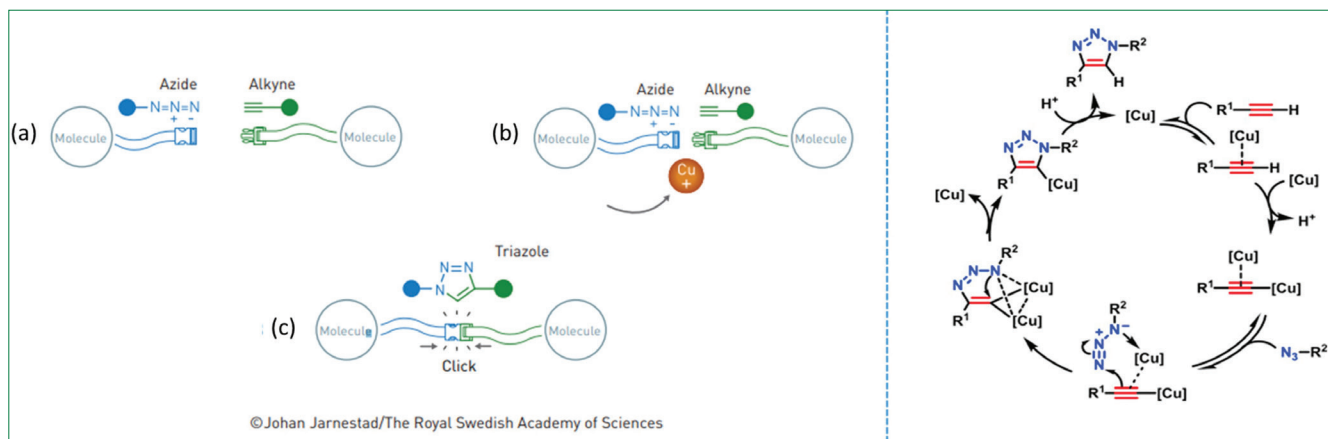


Fig. 2 - Schema esplicativo delle reazioni di cicloaddizione classica (a) e Cu(I)-catalizzata (b,c), a sinistra; ciclo catalitico e meccanismo della CuAAC, a destra [6]

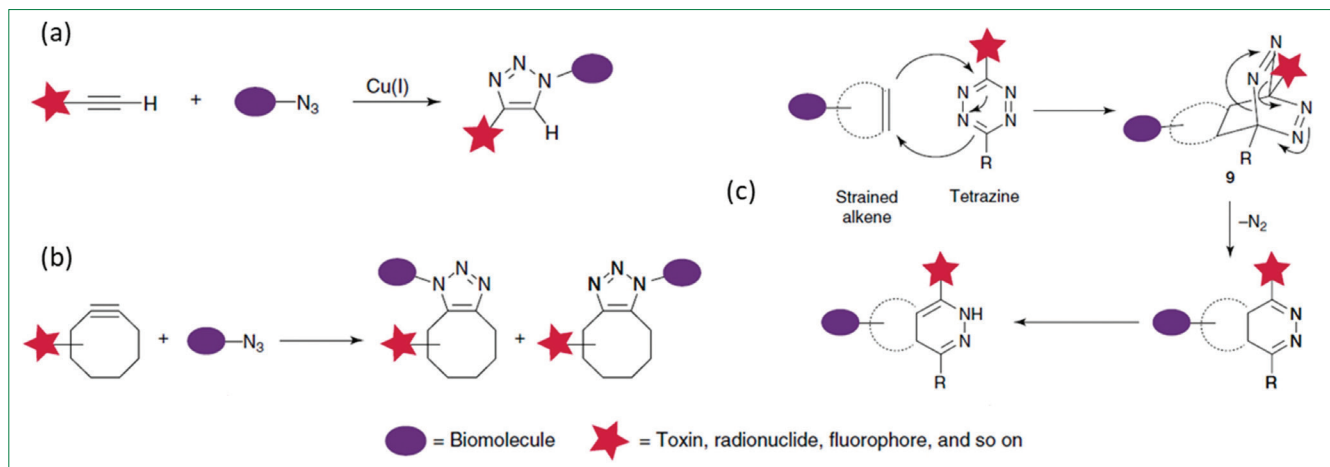


Fig. 3 - Esempi di reazioni bioortogonali [10]

teresse chimico e farmaceutico, in quanto inerti in varie condizioni (ossidazione, riduzione, idrolisi), nonché compatibili con vari gruppi funzionali e un'ampia gamma di solventi. In aggiunta, l'1,2,3-triazolo è un bioisostero del legame ammidico ed è spesso impiegato nella chimica farmaceutica quale surrogato per migliorare la stabilità dei composti [7]. Rapidamente, tali reazioni catturarono l'interesse di varie discipline e, per la propria versatilità, vengono impiegate ancora oggi per vari scopi.

La sua efficacia, combinata con robustezza e facilità di esecuzione, hanno reso questa reazione una metodica standard per l'interconnessione di *building blocks* eterogenei, rappresentando l'emblema dell'approccio di *click chemistry* al punto che, ad oggi, la CuAAC ne è un sinonimo.

Dalla Click-Chemistry alle Reazioni Bioortogonali in sistemi biologici

L'immenso 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 "bioortogonale" [8]. In pratica con questo termine si vogliono intendere tutte quelle reazioni di click chemoselettive che si possono verificare tra gruppi chimici complementari, non disponibili nei sistemi cellulari in condizioni fisiologiche, senza interferire o essere influenzate da processi biologici concomitanti (Fig. 3) [9].

Tuttavia al netto della dimostrata efficacia della

CuAAC in sistemi biologici (Fig. 3a), l'eventuale tossicità del rame continuava a limitarne l'uso in sistemi viventi superiori (es. roditori). 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, tali da migliorarne l'efficienza *in vivo*.

Prendendo spunto dagli studi precedentemente condotti da Huisgen su reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolari tra fenilazidi e derivati norbornenici [2], e quindi da G. Wittig e A. Krebs sull'elevata reattività di dipolarofili alchidici ciclici [11], agli inizi del 2004 C.R. Bertozzi e collaboratori decisero di utilizzare derivati cicloottinici, quali sistemi ciclici altamente tensionati, come alternativa all'utilizzo della CuAAC in sistemi biologici. I ricercatori misero a punto questo processo sintetico di (3+2)-cicloaddizione, definito poi come la "strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)", tra un'azide sostituita ed un derivato cicloottinico opportunamente modificato (Fig. 3b) [12]. Tale processo si basa sul principio che la tensione interna dell'anello cicloottinico, dovuta ad una distorsione dell'angolo di legame (da 180° a 160°), ha un potenziale energetico sufficientemente elevato per aumentare la velocità di cicloaddizione tra azide-alchino senza l'uso di un catalizzatore metallico, in quanto porta ad alleviare la tensione d'anello indotta dalla funzionalità alchidica. Basandosi su questo razionale, Bertozzi ed altri gruppi decisero di focalizzarsi sullo sviluppo della SPAAC per applicazioni *in vivo*. In questo contesto, l'impiego di derivati cicloottinici sostituiti con

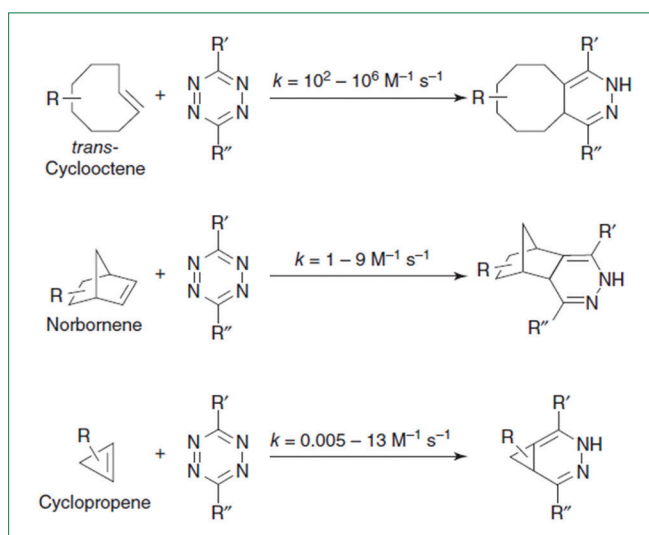


Fig. 4 - Esempi di IEDDA con vari dienofili [10]

azidi opportunamente progettate ha portato allo sviluppo di una serie di evidenze sperimentali sia in cellule integre che in animali [13].

Tuttavia, la vera svolta per un approccio biocompatibile della *click chemistry* è stata raggiunta con lo sviluppo e l'applicazione di una reazione di cicloadizione [4+2] tra un diene (ad es. tetrazine) e dienofili stericamente tensionati (ad es. alcheni, alchini). Questa procedura, detta "*inverse electron-demand Diels-Alder (IEDDA)*", sfrutta l'accoppiamento tra dieni elettron-poveri e dienofili elettron-ricchi e produce, attraverso una reazione retro-Diels-Alder, una diidropiridazina stabile, liberando una molecola di azoto (Fig. 3c) [14]. Questa reazione riscosse

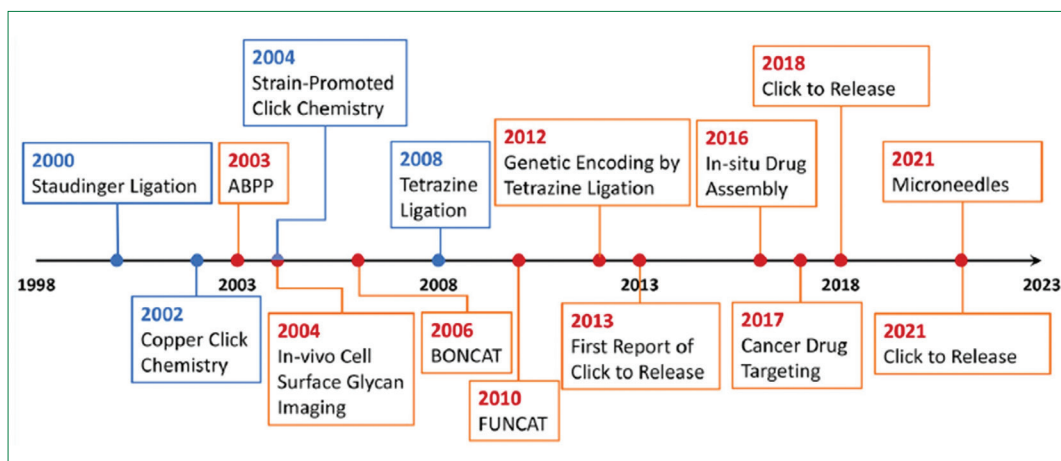
subito molto interesse grazie soprattutto alle veloci cinetiche di reazione (con costanti di velocità del secondo ordine, comprese tra 10^2 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a seconda delle combinazioni di diene/dienofilo utilizzate. A questo proposito, numerosi studi sono stati condotti per

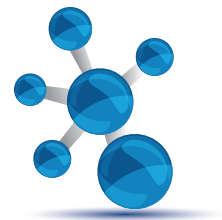
ottimizzare sia la porzione tetrazinica, in termini di reattività, stabilità chimica e coniugazione con sistemi fluorogenici opportuni, che il dienofilo, tra cui i più impiegati sono i derivati *trans*-ciclootteni, norbornenici e ciclopropenici (Fig. 4).

Le elevate cinetiche di reazione, anche in assenza di catalizzatori, unite alla compatibilità con un'ampia gamma di condizioni sperimentali, hanno permesso a questo innovativo approccio di poter essere applicato con più semplicità e versatilità nello studio di sistemi biologici.

Fin dalle prime evidenze, diversi gruppi, tra cui quello di Bertozzi presso l'Università di Stanford, hanno percepito l'elevato potenziale dell'utilizzo della reazione IEDDA soprattutto per lo studio di processi biologici in animali. L'opportuna combinazione di tetrazine fluorogeniche, capaci di produrre una marcata fluorescenza solo quando attivate nella reazione di cicloadizione, con adeguati alcheni ciclici tensionati ha consentito di studiare, modulare e visualizzare processi biologici *in vitro*, *ex-vivo* e, soprattutto, *in vivo* utili alla comprensione di patologie ancora prive di efficaci approcci terapeutici nell'uomo [15].

I due concetti di *click chemistry* e di chimica bioortogonale hanno avuto un impatto enorme sulla chimica ed in generale sulle scienze applicate. Le scoperte della CuAAC, della SPAAC e delle reazioni ad esse correlate hanno permesso di raggiungere significativi risultati, stimolando un'intensa attività in aree scientifiche eterogenee. Tutto ciò ha

Fig. 5 - Sviluppo temporale ed applicazioni di *click chemistry* e reazioni bioortogonali [16]



portato all'identificazione e allo sviluppo di un'ampia gamma di reazioni che compongono l'ampia tavolozza della *click chemistry* e possono essere applicate nel contesto della chimica bioortogonale (Fig. 5).

Sin dai primi anni 2000, numerosi ed importanti sono stati gli sviluppi e le applicazioni della *click chemistry* e della chimica bioortogonale, che hanno avuto un significativo impatto sia in biologia che in medicina. Queste tecniche sono state ampiamente utilizzate in ambito biofarmaceutico ed hanno permesso una migliore comprensione di strutture biologiche, meccanismi e organelli cellulari, il cui ultimo fine è stato quello di consentire lo sviluppo di agenti diagnostici, prima, e, successivamente, trattamenti terapeutici più efficaci e selettivi.

Sebbene sia già stato fatto molto lavoro per lo sviluppo della chimica bioortogonale come strumento prezioso sia per i chimici che per i biologi, stiamo appena iniziando a realizzare il pieno potenziale di queste reazioni per il loro utilizzo *in vivo*. Man mano che il campo continuerà a maturare, crescerà anche l'ambito delle sue applicazioni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.
- [2] a) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1963, **2**, 565; b) R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.*, 1961, 357; c) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.*, 1989, **61**, 613.
- [3] A. Michael, *J. Prakt. Chem.*, 1893, **48**, 94.
- [4] R. Ramapanicker, P. Chauhan, *Click Reactions in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, 1.
- [5] a) C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057; b) V.V. Rostovtsev, L.G. Green *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596; c) F. Himo, T. Lovell *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **127**, 210.
- [6] Immagini adattate da https://www.nobelprize.org/uploads/2022/10/fig2_ke_en_22_clickReaction.pdf e R.S. Gomes, G.A.M. Jardim *et al.*, *Tetrahedron*, 2019, **75**, 3697.
- [7] a) G.C. Tron, T. Pirali *et al.*, *Med. Res. Rev.*, 2008, **28**, 278; b) L.M. Rečnik, W. Kandioller, T.L. Mindt, *Molecules*, 2020, **25**, 3576; c) A. Massarotti, *Protein-Ligand Interactions and Drug Design. Methods in Molecular Biology*, Humana, New York, 2021, **2266**, 3.
- [8] D.H. Dube, C.R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 616.
- [9] a) H.C. Hang, C. Yu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 14846; b) G.A. Lemieux, C.L. Graffenried *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4708.
- [10] Immagini adattate da C.G. Gordon, C.R. Bertozzi, *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, 417.
- [11] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.*, 1961, **94**, 3260.
- [12] N.J. Agard, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15046.
- [13] a) J.C. Jewett, E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3688; b) J.M. Baskin, J.A. Prescher *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 16793.
- [14] a) M.L. Blackman, M. Royzen, J.M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518; b) N.K. Devaraj, R. Weissleder, S.A. Hilderbrand, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 2297.
- [15] K. Porte, M. Riberaud *et al.*, *ChemBioChem.*, 2020, **22**, 100.
- [16] R.E. Bird, S.E. Lemmel *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2021, **32**, 2457.

It is all about a "Click": the Reasons for the Nobel Prize In Chemistry 2022

The Nobel Prize in Chemistry 2022 celebrates the *Click Chemistry*, the methodological approach developed by K.B. Sharpless and M. Meldal, which allows, in a simple and effective way, the connection of small units for the synthesis of more advanced chemical compounds. C.R. Bertozzi applied this strategy to the development of *Bioorthogonal Chemistry*, allowing the study of biopharmacological processes in living systems, encouraging its broader interdisciplinary applications.