

# Kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen: Erkenntnisse und Perspektiven\*\*

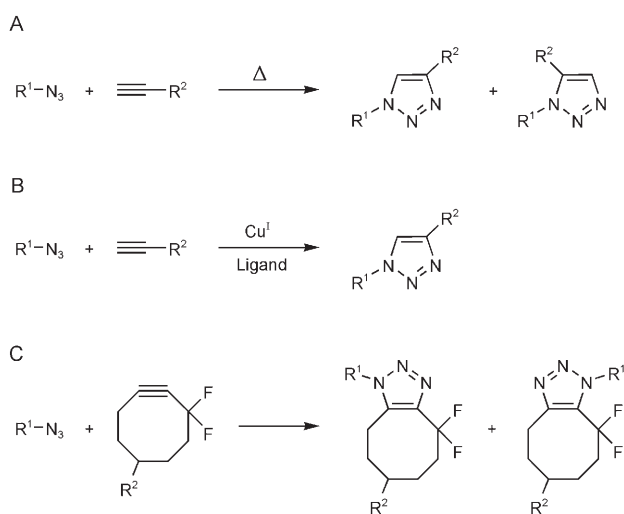
Jean-François Lutz\*

Alkine · Azide · Biokonjugation · Biotechnologie · Cycloadditionen

**Z**weifellos ist das von Sharpless, Kolb und Finn 2001 vorgeschlagene Klick-Konzept einer der bemerkenswertesten Synthesetrends in diesem Jahrhundert.<sup>[1]</sup> Der einprägsame Ausdruck „Klick“ bezieht sich dabei auf energetisch begünstigte, spezifische und vielseitige chemische Umwandlungen, die zu einem einzigen Reaktionsprodukt führen. Das wesentliche Merkmal der Klick-Chemie ist ihre Einfachheit und Effizienz.<sup>[2,3]</sup> Dieses Konzept scheint perfekt auf die derzeitigen Anforderungen von Wissenschaftsgebieten wie der Molekularbiologie, dem Arzneimitteldesign, der Biotechnologie, der makromolekularen Chemie oder den Materialwissenschaften zugeschnitten zu sein.<sup>[3,4]</sup> Während der letzten Jahre konzentrierte man sich weniger auf komplizierte Reaktionen, die entweder komplexer apparativer Aufbauten, harscher Reaktionsbedingungen oder anspruchsvoller Reinigungsverfahren bedürfen, als im vergangenen Jahrhundert, sondern versuchte vielmehr, sie allmählich durch einfachere Reaktionen zu ersetzen. In diesem Zusammenhang sind die einfachen Klick-Reaktionen in Hochschule wie Industrie derzeit sehr populär.

Reaktionen vom Klick-Typ sind sehr selten; in den letzten Jahren konnte man aber die Entstehung eines rudimentären Klick-„Werkzeugkastens“ mitverfolgen, der beispielsweise Diels-Alder-Cycloadditionen, Thiol-En-Additionen, Oxim-bildung und kupferkatalysierte Huisgen-Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC) umfasst.<sup>[5]</sup> Der Ausdruck Klick-Chemie blieb in der neueren Literatur jedoch beinahe ausschließlich den letztgenannten Reaktionen vorbehalten. Die Synthese von 1,2,3-Triazolen mithilfe 1,3-dipolarer Cycloadditionen von Aziden und Alkinen wurde von Arthur Michael Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt und durch Rolf Huisgen in den 1960er Jahren entscheidend weiterentwickelt.<sup>[6,7]</sup> Ohne Übergangsmetallkatalysator verlaufen diese Reaktionen allerdings nicht regioselektiv, relativ langsam und erfordern

hohe Temperaturen, um akzeptable Ausbeuten zu erreichen (Schema 1 A). 2002 beschrieben Meldal und Mitarbeiter, dass der Einsatz katalytischer Mengen an Kupfer(I), das an terminale Alkine binden kann, zu schnellen, hocheffizienten und



**Schema 1.** Unterschiedliche Typen der Azid-Alkin-Cycloaddition: A) thermische Cycloaddition (Standardtyp),<sup>[7]</sup> B) Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition,<sup>[8,9,11]</sup> C) durch Ringspannung begünstigte und fluoraktivierte Cycloaddition.<sup>[12]</sup>

regioselektiven Azid-Alkin-Cycloadditionen bei Raumtemperatur in organischen Medien führt (Schema 1 B).<sup>[8]</sup> Kurz danach zeigten Sharpless, Fokin et al., dass die CuAAC in *tert*-Butylalkohol, Ethanol oder reinem Wasser eingesetzt werden kann.<sup>[9]</sup> Diese beiden wichtigen Entwicklungen führten zu einer bemerkenswerten Renaissance der Cycloadditionen vom Huisgen-Typ. Dementsprechend stieg die Zahl der Forschungsarbeiten zur CuAAC in der organischen und anorganischen Chemie, der Polymerchemie sowie der Biochemie in den letzten Jahren exponentiell. Zahlreiche Autoren demonstrierten, dass die CuAAC ein gelungenes Beispiel für eine effiziente und vielseitige Klick-Chemie darstellt.<sup>[10]</sup>

Speziell für biologische Anwendungen haben sich Azid-Alkin-Cycloadditionen als sehr geeignet erwiesen, denn sie können unter experimentellen Bedingungen, die mit biologischen Umgebungen (z. B. wässrigem Medium, Körpertemperatur) kompatibel sind, durchgeführt werden. Des Weiteren

[\*] Dr. J.-F. Lutz

Forschungsgruppe: Nanotechnology for Life Science  
Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung  
Geiselbergstraße 69, Potsdam 14476 (Deutschland)  
Fax: (+49) 331-568-3000  
E-Mail: lutz@iap.fhg.de  
Homepage: <http://www.nano-lifescience.com>

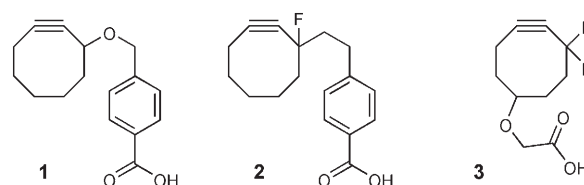
[\*\*] J.F.L. dankt der Fraunhofer-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung sowie Juliane Kristen für die Übersetzung des Highlights ins Deutsche.

ren kommen Azid- und Alkinfunktionen in biologischen Systemen nicht bzw. relativ selten vor. Die Azid-Alkin-Chemie bietet deshalb eine interessante chemoselektive Plattform für die Funktionalisierung oder Ligation biologischer Systeme. Die CuAAC ist beispielsweise vielversprechend für die Herstellung einer breiten Palette an Biomaterialien wie stationärer Phasen für die Bioseparation, ortsspezifisch modifizierter Proteine oder Viren, Arzneimittel- oder Genvektoren, Protein- oder Oligonucleotid-Mikroarrays und funktionalisierter Zelloberflächen.<sup>[13,14]</sup> In einigen Fällen kann das Vorhandensein von Übergangsmetallkatalysatoren jedoch ein Problem sein. So wurden einige Beispiele von kupferinduziertem Zerfall von Viren oder Oligonucleotidsträngen *in vitro* beschrieben.<sup>[14]</sup> Zudem können Kupferionen toxisch auf lebende Organismen wirken, wenn sie in größeren Mengen als in Spuren vorkommen. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung metallfreier Klick-Strategien wichtig. Forscher am Scripps-Institut demonstrierten, dass kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen geeignete Reaktionen für die durch das Zielmolekül gesteuerte Synthese von Enzyminhibitoren sind.<sup>[15]</sup> In diesem Fall wurde die Langsamkeit der Standard-Huisgen-Cycloaddition bei 37°C elegant in einen Vorteil verwandelt, da bei dieser Anwendung niedrige Geschwindigkeiten benötigt werden. Außerdem wird die Regioselektivität der Klick-Reaktion bei dieser Strategie nicht durch einen zugesetzten Katalysator, sondern durch Beschränkung auf die Bindungstaschen der Enzyme induziert. Eine derartige Herangehensweise ist jedoch sehr speziell und kann nicht auf Standardligationen ausgedehnt werden.

Eine elegante, metallfreie Strategie zum Aufbau von 1,2,3-Triazolbindungen wurde von Cornelissen et al. entdeckt.<sup>[16]</sup> Dieses Verfahren setzt nicht auf substituierte Alkine, sondern auf Oxanorbornadiene. Diese reagieren mit organischen Aziden über eine [3+2]-Cycloaddition-Retro-Diels-Alder-Tandemreaktion. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion bei Raumtemperatur schneller abläuft als die üblichen Azid-Alkin-Cycloadditionen von Huisgen-Typ. Über diesen Reaktionsweg ließen sich Modellpeptide und -proteine modifizieren. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die Bildung eines relativ toxischen Nebenproduktes (eines Furans) während des Retro-Diels-Alder-Reaktionsschrittes.

Kürzlich schlugen Bertozzi und Mitarbeiter eine interessante Strategie für eine kupferfreie Azid-Alkin-Cycloaddition vor, die auf gespannten Cycloalkinen beruht (Schema 1 C).<sup>[12,17–19]</sup> Dieser Ansatz geht auf die späten Arbeiten von Georg Wittig zurück, der die exotherme Cycloaddition von Cyclooctinen mit Phenylaziden zu Triazolen bei guten Ausbeuten beschrieb.<sup>[20]</sup> Die hohe Reaktivität resultiert aus der Deformation der Alkin-Bindung wegen der Ringspannung.

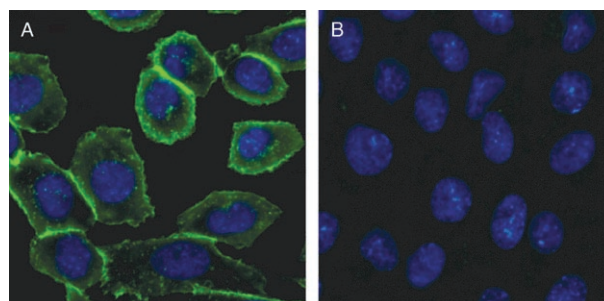
Bertozzi et al. untersuchten Klick-Reaktionen neuartiger substituierter Cyclooctine (Schema 2) mit Aziden. In der ersten Veröffentlichung wurde demonstriert, dass **1** [3+2]-Cycloadditionen mit niedermolekularen Verbindungen wie 2-Azidoethanol, Benzylazid oder *N*-Butyl- $\alpha$ -azidoacetamid eingeht.<sup>[17]</sup> Weiterhin wurde die Eignung dieses kupferfreien Verfahrens für die chemoselektive Modifizierung von Biomolekülen und lebenden Zellen aufgezeigt. Azid-modifizier-



**Schema 2.** Cyclooctine für durch Ringspannung geförderte Cycloadditionen mit funktionalisierten Aziden.<sup>[12,17,18]</sup>

te humane Leukämie-T-Zellen können beispielsweise mit einem Biotinderivat von **1** funktionalisiert werden, ohne dass cytotoxische Effekte beobachtet werden. Die Cycloadditionen dieses Cycloalkins verlaufen allerdings langsamer als die CuAAC.

Diese Situation wurde durch die Einführung elektronenziehender Substituenten in der  $\alpha$ -Position der Dreifachbindung deutlich verbessert (Schema 2, **2** und **3**).<sup>[12,18]</sup> Beispielsweise wurden Fluorsubstituenten gewählt, da sie sich relativ inert in einer biologischen Umgebung verhalten. Erst kürzlich wurde berichtet, dass **3** zu sehr schnellen und effizienten Azid-Alkin-Cycloadditionen führt.<sup>[12]</sup> Diese Reaktionen verlaufen nicht regioselektiv, zeigen aber einige Klick-Eigenschaften in dem Sinne, dass sie chemoselektiv verlaufen und direkt unter physiologischen Bedingungen angewendet werden können. Des Weiteren zeigen durch Ringspannung begünstigte und fluoraktivierte Cycloadditionen Reaktionskinetiken, die denen der CuAAC vergleichbar sind. Die Oberfläche von Säugerzellen konnte beispielsweise durch Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb weniger Minuten mit diesem Verfahren funktionalisiert werden (Abbildung 1). Boons und



**Abbildung 1.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Eizellen des Chinesischen Zwerghamsters 1 min nach der Reaktion mit einem fluoreszierenden Derivat von **3**: A) Azid-funktionalisierte Zellen, B) Kontrollzellen ohne Azidgruppen.<sup>[12]</sup> Quelle: Carolyn Bertozzi (UC Berkeley).

Mitarbeiter berichten über ein weiteres Beispiel einer schnellen kupferfreien Azid-Alkin-Biokonjugation.<sup>[21]</sup> Ihre Methode baut auf substituierte Dibenzocyclooctine und ermöglicht eine effiziente Markierung lebender Zellen.

Diese aktuellen Befunde von Bertozzi, Boons und Mitarbeitern sind ein bedeutender Fortschritt für die selektive Funktionalisierung und Ligation biologischer Spezies. Cyclooctin-Ligationen haben ein großes Potenzial für die chemische Biologie sowie einige Bereiche der Materialwissenschaften, in denen die Verwendung von Übergangsmetallen

problematisch ist. Es ist aber wohl auszuschließen, dass diese Reaktionen die CuAAC schon bald völlig ersetzen werden, wenn man bedenkt, dass die Synthese substituierter Cyclooctine recht anspruchsvoll ist und die fehlende Regioselektivität bei durch Ringspannung begünstigten Cycloadditionen bei manchen Anwendungen (z.B. Arzneimittelforschung, Peptidmimetika) problematisch sein könnte. Dennoch sind diese neuen Reaktionstypen vielversprechende bioverträgliche, komplementäre Werkzeuge für die Klick-Chemie.

Online veröffentlicht am 8. Februar 2008

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [2] a) C. J. Hawker, V. V. Fokin, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 381–383; b) C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Science* **2005**, *309*, 1200–1205.
- [3] J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036–1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018–1025.
- [4] a) W. H. Binder, C. Kluger, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1791–1815; b) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68; c) Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674–1689; d) A. Dondoni, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 700–708; e) M. V. Gil, M. J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis* **2007**, 1589–1620; f) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7–17.
- [5] J.-F. Lutz, H. Schlaad, *Polymer* **2008**, *49*, 817–824.
- [6] A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94.
- [7] a) R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604–637; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598; b) R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 742–754; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 633–645.
- [8] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [9] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [10] a) J. P. Collman, N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **2004**, *20*, 1051–1053; b) D. D. Díaz, S. Punna, P. Holzer, A. K. McPherson, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Polym. Sci. Part A* **2004**, *42*, 4392–4403; c) B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020–15021; d) P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4018–4022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928–3932; e) J.-F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 514–518; f) N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558–3561.
- [11] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2250–2255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210–2215.
- [12] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [13] a) T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609–612; b) A. Deiters, T. A. Cropp, D. Summerer, M. Mukherji, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5743–5745; c) A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598–10602; d) S. Punna, E. Kaltgrad, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1536–1541; e) P. C. Lin, S. H. Ueng, M. C. Tseng, J. L. Ko, K. T. Huang, S. C. Yu, A. Kumar Adak, Y. J. Chen, C. C. Lin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4392–4396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286–4290; f) J.-F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6376–6383; g) X. Jiang, M. C. Lok, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 2077–2084; h) J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1–39.
- [14] a) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193; b) J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [15] a) R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809–12818; b) V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 118–122; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 116–120; c) M. Whiting, J. Muldoon, Y. C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1463–1467; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435–1439.
- [16] S. S. van Berkel, A. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508.
- [17] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [18] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [19] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1211–1219.
- [20] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275; A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154.
- [21] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.