

# Zuverlässige und effiziente Konjugation von Biomolekülen über Huisgen-Azid-Alkin-Cycloadditionen

Enrique Lallana, Ricardo Riguera und Eduardo Fernandez-Megia\*

Biomakromoleküle · Klick-Chemie · Synthesemethoden

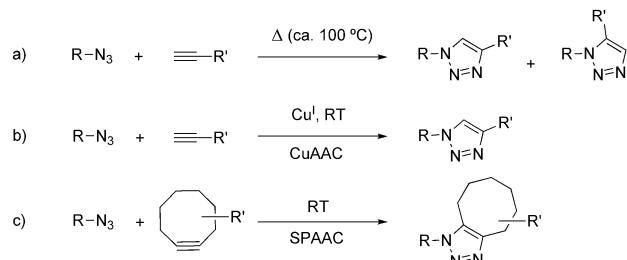
**D**ie Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) ist ein etabliertes Biokonjugationsverfahren für Proteine, Nucleinsäuren und Polysaccharide. Der Einsatz von Cu führt aber zu einigen Problemen, hauptsächlich in Form von oxidativen Zersetzungsprozessen durch reaktive Sauerstoffspezies sowie einer Kontamination der Probe mit Cu. Dieser Kurzaufsatz stellt die wichtigsten Fortschritte bei der effizienten und schonenden Funktionalisierung von Biomakromolekülen über CuAAC und die Cu-freie ringspannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) vor.

## 1. Einführung

Im Jahr 2001 führten Kolb, Finn und Sharpless das Konzept der Klick-Chemie auf dem Gebiet der Wirkstoffentwicklung ein. Aus aktivierten Bausteinen werden durch eine Reihe bemerkenswerter orthogonaler, thermodynamisch angetriebener Prozesse leicht und effizient Wirkstoffkandidaten aufgebaut.<sup>[1]</sup> Die Grundlage der Klick-Chemie bildet eine Gruppe zuverlässiger Umwandlungen, die eine große Bandbreite an Substraten unter milden Bedingungen glatt umsetzen, wobei die Produkte nach einem einfachen oder direkt ohne Reinigungsschritt in hohen Ausbeuten erhalten werden. Seit der Einführung des Klick-Konzepts wurden diese einfachen und effizienten Kupplungsverfahren auch in vielen anderen Forschungsfeldern angewendet.

Die von Huisgen<sup>[2]</sup> entwickelte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (AAC, Schema 1) ist der prominenteste Vertreter unter den heute als Klick-Reaktionen bezeichneten Verfahren. Bei der klassischen thermischen Version dieser Cycloaddition (Schema 1a) handelt es sich um einen sehr zuverlässigen Prozess, der mit vielen Reaktionsbedingungen und funktionellen Gruppen verträglich ist. Weil natürliche Substrate praktisch keine Azid- oder Alkingruppen enthalten, ist die AAC außerdem intrinsisch bioorthogonal. Doch

erst nachdem die Gruppen um Meldal<sup>[3]</sup> sowie Fokin und Sharpless<sup>[4]</sup> die Cu<sup>I</sup>-katalysierte Variante dieser Cycloaddition (CuAAC, Schema 1b) entdeckt hatten, wurde ihr Potenzial als Kupplungsverfahren voll ausgeschöpft. Cu<sup>I</sup>-katalysierte Cycloadditionen von endständigen Alkinen haben nicht nur deutlich verringerte Aktivierungsbarrieren (was zügige Umsetzungen bei Raumtemperatur ermöglicht), sondern sie ergeben auch ausschließlich die 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazole.<sup>[5]</sup> Diese Entdeckung hat den Anwendungsbereich der AAC über die organische Synthese hinaus auf weitere Gebiete der Chemie sowie die Polymerwissenschaften und die Biologie vergrößert.<sup>[6]</sup>



**Schema 1.** Thermische (a), Cu<sup>I</sup>-katalysierte (b) und ringspannungsvermittelte (c) Azid-Alkin-Cycloadditionen.

Die Anwendung der CuAAC als Biokonjugationsverfahren stieß aber auf Hindernisse. Der erforderliche Cu<sup>I</sup>-Katalysator kann die Biomolekülstrukturen schwer schädigen, und CuACCs verlaufen bei Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich, wie sie für Biokonjugationsversuche typisch sind, oft nur schleppend. In diesem Kurzaufsatz analysieren wir daher die Probleme von CuACCs in diesem Zusammenhang, und wir betrachten Lösungsvorschläge für

[\*] Dr. E. Lallana, Prof. R. Riguera, Prof. E. Fernandez-Megia  
Departamento de Química Orgánica und Centro de Investigación en Química Biológica e Materiais Moleculares  
Universidade de Santiago de Compostela (CIQUS)  
15782 Santiago de Compostela (Spanien)  
E-Mail: ef.megia@usc.es

die effiziente und schonende In-vitro-Funktionalisierung von Biomakromolekülen durch CuAACs. Auch die ringspannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition (strain-promoted azide–alkyne cycloaddition (SPAAC), Schema 1c), ein bequemes Cu-freies AAC-Verfahren, das kürzlich von Bertozzi und Mitarbeitern entwickelt wurde,<sup>[7]</sup> wird eingehend diskutiert.

## 2. Effiziente und schonende CuAAC-Protokolle für die Biokonjugation von Proteinen und Bionanopartikeln

Auf einige Einschränkungen der CuAAC bei der Funktionalisierung von Biomakromolekülen haben Fokin, Sharpless, Finn und Mitarbeiter schon früh hingewiesen. Sie fanden, dass Augenbohnen-Mosaikviren (cowpea mosaic virus, CPMV) unter den ursprünglich für die CuAAC genutzten Bedingungen ( $\text{CuSO}_4/\text{Natriumascorbat}$  oder  $\text{CuSO}_4/\text{Cu-Draht}$ ) entweder zersetzt wurden oder aggregierten.<sup>[8]</sup> Der Zerfall des Viruskapsids wurde mit der Koordination der neu gebildeten Triazolverknüpfungen an  $\text{Cu}^{II}$ -Ionen erklärt. Entsprechend kam es auch bei der Behandlung von triazolhaltigen CPMVs (erzeugt durch AAC ohne Katalysator) mit  $\text{Cu}^{II}$  (oder  $\text{Cu}^I$  an Luft) zur Zersetzung der Viren, während Wildtyp-CPMV unter identischen Bedingungen intakt blieb. CPMV wurde auch in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Ascorbat oder *p*-Hydrochinon zersetzt, die für die In-situ-Reduktion von  $\text{Cu}^{II}$  verwendet wurden. Der Einsatz von  $\text{Cu}^{II}/\text{Cu}$  führte zu einer starken Aggregation der Viren. Dieser Prozess wurde auf das Vorliegen von  $\text{Cu}^{II}$  zurückgeführt, weil die Aggregate nach Zugabe von Ethyldiamintetraessigsäure dissozierten.

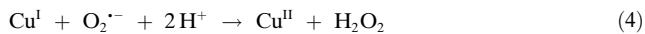
Biomakromoleküle werden unter oxidativem Stress angegriffen, und es ist bekannt, dass Cu dabei eine Rolle spielen kann.<sup>[9]</sup> Cu-Ionen fördern die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die biologische Strukturen schädigen. Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ), die in dieser Hinsicht wirkungsvollsten ROS, werden in einer Fenton-Reaktion aus dem Übergangsmetall im reduzierten Zustand ( $\text{Cu}^I$  im Fall der CuAAC) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet [Gleichung (1)].<sup>[10,11]</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  ent-



steht in situ nach einem von zwei möglichen Mechanismen: In Gegenwart von Ascorbat ( $\text{AscH}_2$ ) kann  $\text{O}_2$  unter Katalyse durch Spuren von  $\text{Cu}^{II}$  oder anderen Übergangsmetallionen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert werden [Gleichung (2)].<sup>[10,12]</sup> Sind weder



Ascorbat noch andere Reduktionsmittel vorhanden, so kann  $\text{Cu}^I$  selbst  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduzieren; in diesem zweistufigen Prozess wird das Superoxid-Radikal anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) als Zwischenstufe durchlaufen [Gleichungen (3) und (4)].<sup>[13]</sup> Die



Enrique Lallana erhielt seinen BS in Chemie an der Universidade de Santiago de Compostela (USC, Spanien) im Jahr 2004. Anschließend arbeitete er für Prof. R. Riguera und E. Fernandez-Megia. Er promovierte 2010 mit einer Arbeit über NMR-spektroskopische Methoden zur Konfigurationsbestimmung von Polyolen und Biokonjugationsverfahren zur Herstellung von Immun-Nanopartikeln. Zurzeit entwickelt er als Postdoktorand in der Gruppe von Prof. N. Tirelli an der University of Manchester (Großbritannien) neue Nanopartikel für den RNA-Transport.



Ricardo Riguera promovierte 1973 an der USC unter Anleitung von Prof. I. Ribas in Chemie und arbeitete als Postdoktorand am University College London für Prof. P. Garrett (1974). Er wurde 1978 zum Lecturer ernannt und nahm 1990 eine Chemie-Professur an der USC an. Seine Forschungsinsteressen umfassen biologisch aktive Naturstoffe, medizinische Chemie und NMR-spektroskopische Methoden zur Bestimmung absoluter Konfigurationen. Zurzeit beschäftigt er sich mit Polymer nanostrukturen für biologische Anwendungen sowie für responsive dynamische Polymere.



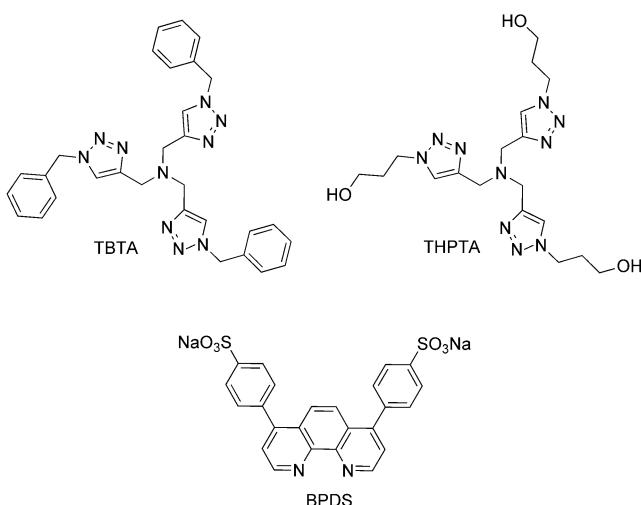
Eduardo Fernandez-Megia promovierte 1995 an der USC unter der Anleitung von Prof. F. J. Sardina in Chemie. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Steven V. Ley an der University of Cambridge (1997–1999) kehrte er als Marie-Curie-Stipendiat und Assistentenprofessor an die USC zurück. 2003 erhielt er ein Ramon-y-Cajal-Stipendium, und 2009 wurde er zum ordentlichen Professor der USC ernannt. Seine Forschungsprojekte verbinden organische und Polymerchemie; Schwerpunkte liegen auf der Herstellung definierter Polymernanostrukturen für biomedizinische Anwendungen und der Entwicklung entsprechender NMR-spektroskopischer Charakterisierungsmethoden.

Gegenwart solcher ROS bei der Funktionalisierung von Biomolekülen wie Proteinen, Nucleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden ist deshalb problematisch, weil sie die Strukturen dieser Substrate schädigen und ihre Funktionsfähigkeit einschränken können. ROS greifen die Aminosäuren in Proteinen an und spalten deren Polypeptidrückgrat;<sup>[14]</sup> entsprechendes wurde auch unter den Bedingungen der CuAAC beobachtet.<sup>[15]</sup>

Die Bildung von Diacetylenen durch  $\text{Cu}^I$ -katalysierte Glaser-Homokupplungen endständiger Alkine tritt als eine weitere Nebenreaktion unter den Bedingungen der CuAAC auf.<sup>[16]</sup> Diese unerwünschten Prozesse verringern die Effizienz des Verfahrens, was sich bei der Funktionalisierung von Makromolekülen, deren Reinigung problematisch, wenn nicht unmöglich ist, besonders unangenehm bemerkbar macht.

Grundsätzlich können die Beschränkungen der CuAAC durch die Verwendung eines maßgeschneiderten Katalysatorsystems umgangen werden. Dazu benötigt man einen  $\text{Cu}^I$ -

chelatisierenden Liganden, der den folgenden Anforderungen genügt: 1) Stabilisierung der Oxidationsstufe Cu<sup>I</sup>; 2) Beschleunigung der Cycloaddition; 3) Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte; und 4) feste Bindung der Cu-Ionen, um diese sicher entfernen zu können und eine Schädigung des Biomoleküls zu verhindern.<sup>[17–20]</sup> Am häufigsten wurden zu diesem Zweck bisher Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA),<sup>[17]</sup> Tris(hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)<sup>[17]</sup> und das Dinatriumsalz von Bathophenanthrolindisulfonat (BPDS)<sup>[18]</sup> eingesetzt (Abbildung 1). Diese Liganden erreichen unter Luftausschluss die gewünschte Stabilisierung der Oxidationsstufe Cu<sup>I</sup> und die Beschleunigung der CuAAC.<sup>[15]</sup>



**Abbildung 1.** Wichtige Cu<sup>I</sup>-bindende Chelatliganden für CuAAC-Biokonjugationen: TBTA, THPTA und BPDS.

Die vierzähligen Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden bilden stabile Chelatkomplexe mit Cu<sup>I</sup>, wobei das Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>II</sup>-Redoxpotential um etwa 300 mV angehoben wird.<sup>[17]</sup> TBTA wurde als erster Vertreter dieser Gruppe identifiziert. Weil TBTA das Cu<sup>I</sup>-Ion so gut gegen Oxidation schützt, kann auch bei Reaktionen in Gegenwart sehr geringer Katalysatormengen üblicherweise auf den Ausschluss von O<sub>2</sub> verzichtet werden. Ein schwerwiegender Nachteil von TBTA ist aber die schlechte Wasserlöslichkeit, die den Zusatz von etwa 10% eines organischen Cosolvats erforderlich macht. Aus diesem Grund wurden wasserlösliche Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden wie THPTA entwickelt. Zum Teil wohl wegen seiner mangelhaften Wasserlöslichkeit beschleunigte TBTA die Cycloaddition in der Regel kaum, sodass diese hinsichtlich ihrer Reaktionsgeschwindigkeit vergleichbar mit klassischen Biokonjugationsverfahren wie Cystein-Maleimid-Kupplung, Aminacylierung und Disulfidbildung aus 2-Thiopyridylsulfid-Vorstufen war.<sup>[8]</sup>

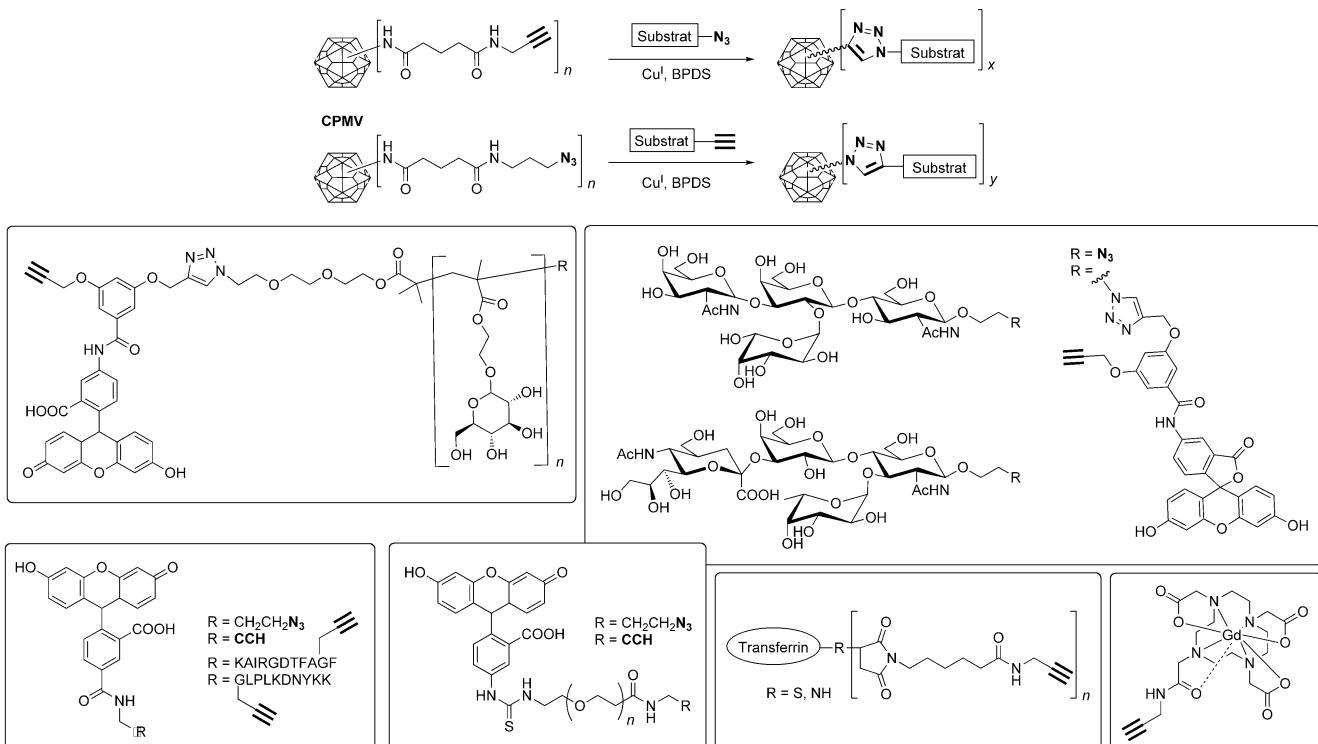
BPDS stellt eine interessante Alternative zu den Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden dar. Es ist sehr gut wasserlöslich und führt zu Katalysatoren, die auch unter starker Verdünnung oder in Gegenwart eines kleinen Überschusses des Kupplungspartners hoch aktiv sind.<sup>[21]</sup> Kombinationen aus BPDS und einem Cu<sup>I</sup>-Salz sind allerdings sehr oxidations-

empfindlich, sodass unter striktem O<sub>2</sub>-Ausschluss gearbeitet werden muss, um die Oxidation von Cu<sup>I</sup> zu verhindern, falls man kein Reduktionsmittel zusetzen möchte. Dass CuAACs mit BPDS in Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit den CuAACs mit TBTA und anderen klassischen Biokonjugationsverfahren überlegen sind, konnten Finn und Mitarbeiter bei der Modifizierung von CPMV mit Proteinen und Peptiden, Polymeren und niedermolekularen Kupplungspartnern elegant demonstrieren (Abbildung 2).<sup>[21]</sup> Sie arbeiteten dabei unter Luftausschluss und setzten [Cu(MeCN)<sub>4</sub>][OTf] als Cu<sup>I</sup>-Quelle ein. Unter ähnlichen Bedingungen gelang die Modifizierung von CPMV mit Gd-Komplexen für die Magnetresonanz-Bildgebung.<sup>[22]</sup> Glycopolymere für die polyvalente Bindung an Lectine auf Zelloberflächen<sup>[23]</sup> und verschiedenen Kohlenhydraten zur Aktivierung entsprechender Antikörper.<sup>[24]</sup> Carricos Gruppe nutzte BPDS/CuBr für die chemoselektive Modifizierung eines humanen Adenovirus vom Typ 5 (hAd5, metabolisch markiert mit Azidozuckern) mit einem FLAG-Peptid, Fluorophoren und dem Krebszell-selektiven Liganden Folat. Das Folat-modifizierte hAd5 resultierte in einer signifikant verbesserten Gentransfektion in murine Brustkrebszellen.<sup>[25]</sup>

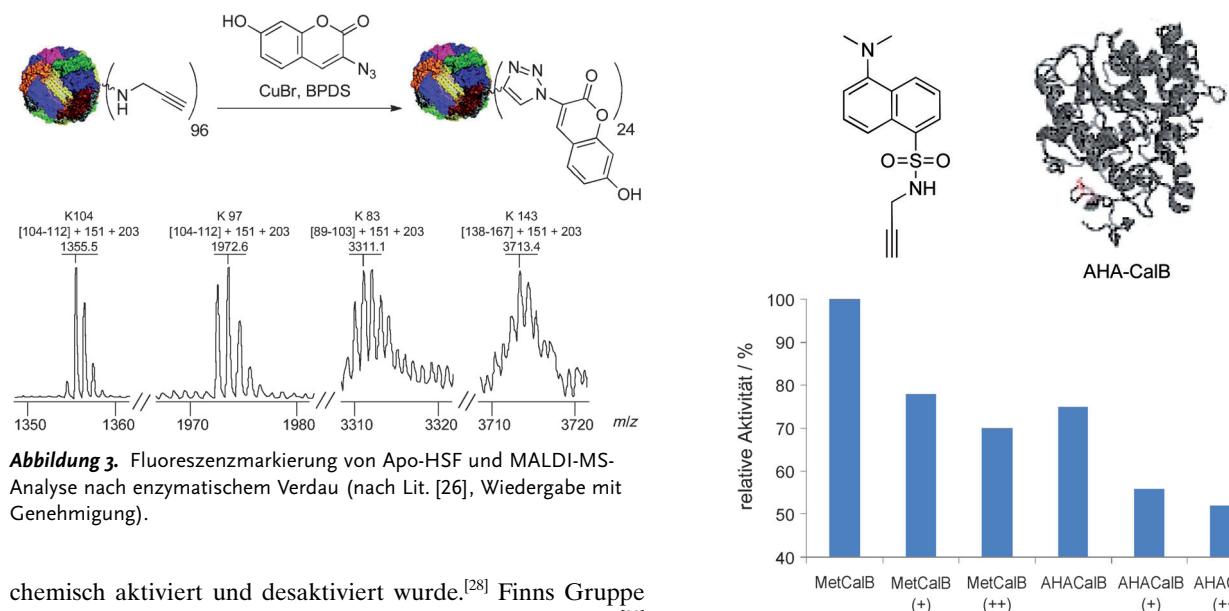
Eine Analyse der Literaturbeispiele spricht dafür, dass CuAAC bei Verwendung eines geeigneten Katalysatorsystems als ein sicheres und effizientes Biokonjugationsverfahren für Proteine und Bionanopartikel zu betrachten ist. Wang und Mitarbeiter berichteten etwa, dass CuSO<sub>4</sub>/Ascorbinsäure und CuSO<sub>4</sub>/Tris(2-carboxyethyl)phosphan (TCEP) die Käfigstruktur des Proteins Pferdemilz-Apoferitin (Apo-HSF) schädigen. Die Behandlung mit CuBr/BPDS unter Luftausschluss ergab dagegen intakte modifizierte Apo-HSF-Partikel,<sup>[26]</sup> wie durch Größenausschlusschromatographie und Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt wurde. Zudem zeigte eine MALDI-MS-Analyse der Produkte nach dem enzymatischen Verdau des mit CuAAC behandelten Proteins Signale bei *m/z*-Werten, die intakten triazolhaltigen Fragmenten entsprechen (Abbildung 3).

In einigen Fällen wurden aber auch dann Proteine mit verminderter biologischer Aktivität erhalten, wenn die Biokonjugation durch CuAAC unter Verwendung dieser Cu<sup>I</sup>-stabilisierenden Liganden ausgeführt wurde. Nach der Markierung durch eine CuAAC in Gegenwart von TBTA (CuSO<sub>4</sub>, TCEP) fanden Bertozzi und Mitarbeiter einen qualitativen Rückgang der Immunreaktivität eines Antikörpers gegen das Glycoprotein GlyCAM-Ig.<sup>[7]</sup> Und van Hest und Mitarbeiter markierten eine *Candida-antarctica*-Lipase B (CalB) mit einem für Lösungsmittel zugänglichen Azido-homoalaninrest (AHA-CalB) durch eine CuAAC (CuSO<sub>4</sub>, Natriumascorbat, BPDS)<sup>[27]</sup> mit einer alkinlierten Dansyl-Sonde, wobei die Aktivität des Enzyms um 31 % abnahm (Abbildung 4). Ein signifikanter Aktivitätsverlust resultierte bereits dann, wenn AHA-CalB und Wildtyp-CalB (Met-CalB) einer Mischung von CuSO<sub>4</sub>, Ascorbinsäure und BPDS ausgesetzt wurden.

Diese Aktivitätsverluste bei Proteinen führten zur Suche nach geeigneteren CuAAC-Biokonjugationsprotokollen. Vor kurzem haben Collman, Chidsey und Mitarbeiter unabhängig voneinander ansprechbaren Elektroden selektiv durch eine CuAAC funktionalisiert, wobei der Cu<sup>I</sup>-Katalysator elektro-



**Abbildung 2.** Polymere, Oligosaccharide, Peptide, Proteine, Fluoreszenzsonden und Bildgebungsagentien wurden durch CuAAC auf der Oberfläche von CPMV verankert.

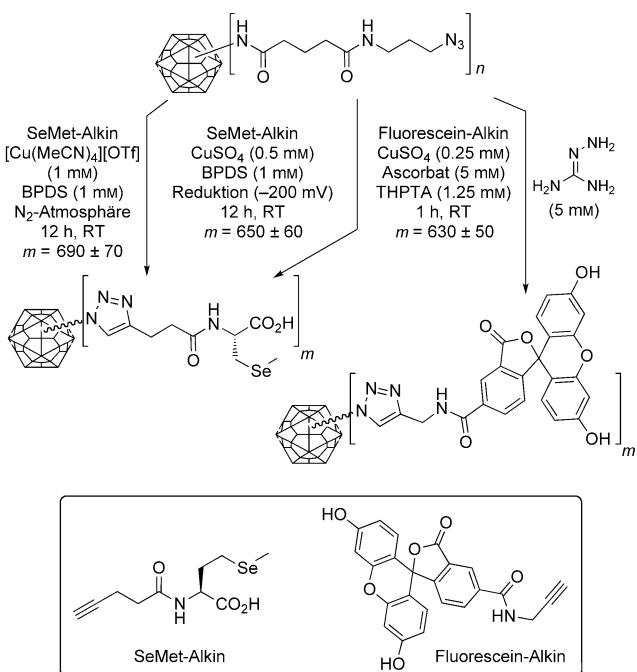


**Abbildung 3.** Fluoreszenzmarkierung von Apo-HSF und MALDI-MS-Analyse nach enzymatischem Verdau (nach Lit. [26], Wiedergabe mit Genehmigung).

chemisch aktiviert und desaktiviert wurde.<sup>[28]</sup> Finns Gruppe passte diese Strategie für die Biokonjugation in Lösung an.<sup>[29]</sup> Bei ihrer Variante wird Cu<sup>II</sup> in Gegenwart der Substrate und des reaktionsbeschleunigenden Liganden elektrochemisch zu Cu<sup>I</sup> reduziert. Dadurch wird die Cu<sup>I</sup> gebildet, ohne dass ein Reduktionsmittel zugesetzt werden muss; dies ist besonders in Hinblick auf die Proteinzersetzung und/oder -fällung durch Reduktionsmittel wie Ascorbat von Bedeutung.<sup>[8]</sup> Zudem wird die oxidative Zersetzung der Substrate durch ROS stark zurückgedrängt, weil O<sub>2</sub> im Reaktionsmedium zu H<sub>2</sub>O reduziert wird (O<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup> + 4e<sup>-</sup> → 2H<sub>2</sub>O). Finn et al. konnten mit dieser effizienten Methode bis zu 650 Moleküle eines Al-

**Abbildung 4.** Effekt der Reaktionsbedingungen einer CuAAC auf die Hydrolyseaktivität von AHA-CalB und Met-CalB: (+) nach Inkubation mit CuSO<sub>4</sub>, Natriumascorbat und BPDS; (++) nach Reaktion mit CuSO<sub>4</sub>, Natriumascorbat, BPDS und einem alkinylierten Dansyl-Derivat (nach Lit. [27], Wiedergabe mit Genehmigung).

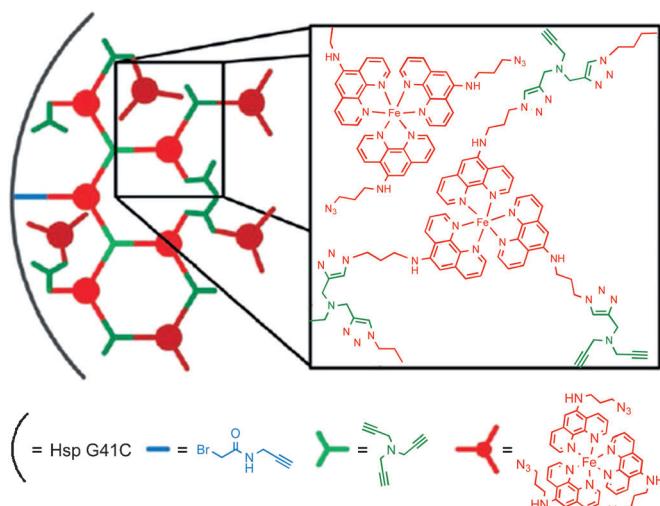
kinderivats von Seleniomethionin an einen azidfunktionalisierten Bakteriophagen Qβ kuppeln (12 h, Raumtemperatur). Dieses Resultat war vergleichbar mit dem Ergebnis einer Reaktion unter O<sub>2</sub>-Ausschluss (Schema 2).<sup>[29]</sup>



**Schema 2.** Funktionalisierung von Bakteriophage Q $\beta$  nach verschiedenen CuAAC-Biokonjugationsprotokollen.

Später schlügen Finn und Mitarbeiter dann ein optimiertes CuAAC-Biokonjugationsprotokoll für Biomakromoleküle vor.<sup>[30]</sup> Dieser allgemeine Ansatz beruht auf dem leicht handzuhabenden und zuverlässigen Cu<sup>II</sup>/Ascorbat-System in Kombination mit dem wasserlöslichen Tris(triazolylmethyl)amin-Ligand THPTA. Dieser Ligand beschleunigt nicht nur die Reaktion, sondern er hemmt auch die Proteinzerstörung durch ROS (indem er den Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das während der Reaktion entsteht, stark beschleunigt und als Radikalfänger wirkt). In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen der Gruppe um Brown bei der Funktionalisierung von Nucleinsäuren (siehe Abschnitt 3)<sup>[31]</sup> empfahlen Finn et al. den Einsatz eines fünffachen Überschusses an THPTA (bezogen auf Cu<sup>I</sup>), um die oxidative Zersetzung auf ein Minimum zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen konnten auch mit Ascorbat (oder dessen Oxidationsprodukten) verbundene Beeinträchtigungen der Proteine durch Zugabe einer äquimolaren Menge des Carbonylfängers Aminoguanidin (bezogen auf Ascorbat) ausgeschlossen werden.<sup>[32]</sup> Nach diesem Verfahren gelang die effiziente Kupplung des azidfunktionalisierten Bakteriophagen Q $\beta$  mit einem Alkinderivat von Fluorescein ohne Zersetzung oder Aggregation des Virus (Schema 2).<sup>[30]</sup> Auf ähnliche Weise wurde Q $\beta$  mit Transferrin<sup>[33]</sup> und mit einem PEG-C<sub>60</sub>-Konjugat gekuppelt.<sup>[34]</sup>

Finn, Park und Mitarbeiter nutzten einen Q $\beta$ -Phagen, den sie unter ähnlichen Reaktionsbedingungen (aber in einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre) mit einem Oligodesoxynucleotid (ODN) versenkt hatten, um durch DNA-gesteuerte Kristallisation mit einem komplementären ODN auf Goldnanopartikeln ein lockeres Gitter aufzubauen.<sup>[35]</sup> Die Gruppe von Douglas erzeugte nach diesem CuAAC-Protokoll Koordinationspolymere im Hohlraum der käfigartigen Proteinmutante Hsp G41C (Abbildung 5), wobei mehr modifiziertes Protein



**Abbildung 5.** Aufbau von Koordinationspolymeren durch CuAAC im Inneren des Proteins Hsp G41C (schematische Darstellung nach Lit. [36], Wiedergabe mit Genehmigung).

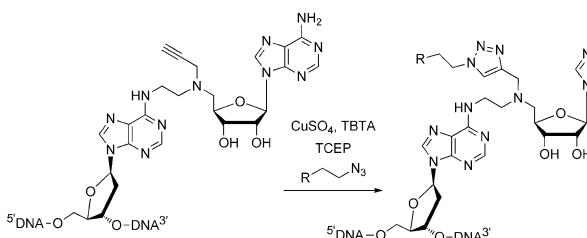
erhalten wurde als beim Einsatz von  $[Cu(CH_3CN)_4][OTf]/BPDS$ .<sup>[36]</sup> Vor kurzem hat Finns Gruppe das Cu<sup>II</sup>/Ascorbat/THPTA/Aminoguanidin-System auch zur Markierung von Glycanen auf der Oberfläche von Säugerzellen eingesetzt.<sup>[37]</sup> Sehr kurze Reaktionsdauer (5 min bei 4 °C) und eine geringe Cu-Konzentration (50  $\mu$ M) ermöglichen eine effektive Markierung ohne merkliche Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zellen.

### 3. Biokonjugation von Nucleinsäuren durch CuAAC

Nucleinsäuren sind ein weiteres anspruchsvolles Anwendungsfeld für Biokonjugationen über CuAAC.<sup>[38]</sup> Die thermische Huisgen-AAC wurde zum Anbringen von Fluoreszenzmarkierungen an Oligodesoxynucleotide (ODNs)<sup>[39]</sup> und für ihre templatvermittelte Immobilisierung auf Glasoberflächen eingesetzt.<sup>[40]</sup> Weil bei diesem Ansatz aber erhitzt werden muss oder aktivierte Kupplungspartner vonnöten sind,<sup>[41]</sup> wurde die CuAAC schon bald auch für die Funktionalisierung von Nucleinsäuren erwogen. Anfangs stieß ihre Anwendung aber auf Probleme: Ähnlich wie bei der Zersetzung von Proteinen führt die Cu-vermittelte Erzeugung von ROS zur Spaltung von Nucleinsäuresträngen über metallunterstützte oder radikalische Mechanismen.<sup>[42]</sup> In der ersten Anwendung von CuAAC auf Nucleinsäuren (mit Oligonucleotiden als Modellsystem) durch Liu und Mitarbeiter kam es daher zu ungefähr 50 % Zersetzung nach nur 10 min bei Raumtemperatur.<sup>[43]</sup>

Die Zersetzung der Oligonucleotide lässt sich in gewissem Maß vermeiden, wenn die CuAAC durch Mikrowellenbestrahlung in Lösung oder unter Verwendung eines festen Trägers beschleunigt wird. Dieses Vorgehen ergab die Konjugate nach kürzeren Reaktionsdauern in höherer Reinheit als klassische Verfahren.<sup>[44]</sup> Aber auch diese Reaktionen gehen noch mit Zersetzung einher, und O<sub>2</sub> sollte gleichfalls ausgeschlossen werden.<sup>[45]</sup>

Eine Alternative bietet der Einsatz Cu<sup>I</sup>-stabilisierender Liganden, um die oxidative Zersetzung der Nucleinsäure zurückzudrängen. Bahnbrechende Anwendungen von TBTA in Kupplungen mit Nucleinsäuren stammen von den Gruppen um Rajski<sup>[46]</sup> und Carell,<sup>[47]</sup> die ODNs und lange DNA-Ketten durch CuAAC modifizierten (Schema 3). Bei Zusatz von



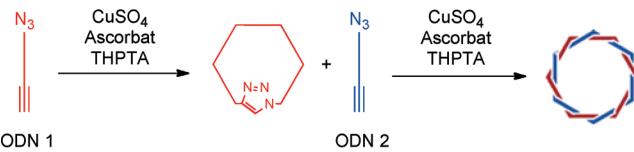
**Schema 3.** CuAAC einer alkylierten DNA (nach Lit. [46], Wiedergabe mit Genehmigung).

TBTA blieben die Substrate intakt (bestätigt durch denaturierende Polyacrylamid-Gelektrophorese, DPAGE), ohne den Liganden kam es dagegen zu einer beträchtlichen Depolymerisation. In Gegenwart von TBTA konnten Collman, Kool, Chidsey und Mitarbeiter überdies ODNs durch CuAAC an selbstorganisierte Monoschichten kuppeln.<sup>[48]</sup>

Diese erfolgreichen Anwendungen von TBTA etablierten die CuAAC als zuverlässiges Modifizierungsverfahren für Nucleinsäuren. Carell und Mitarbeiter untersuchten daher die hochdichte Funktionalisierung langer DNA-Ketten mit einer Kombination aus Polymerasekettenreaktion (PCR) und CuAAC.<sup>[49]</sup> Durch PCR erhielten sie DNA-Stränge mit bis zu 2000 Basenpaaren und 800 Alkingruppen pro Kette, wobei synthetische alkinfunktionalisierte Nucleotidtriphosphate in ausgewählte Gene eingeführt wurden. Die alkinfunktionalisierte DNA wurde dann durch CuAAC in Gegenwart von TBTA ohne Zersetzung in ausgezeichneten Ausbeuten mit Sacchariden gekuppelt (Schema 4). Eine HPLC-MS-Analyse der Produkte nach dem enzymatischen Verdau dieser triazolhaltigen DNA-Ketten ergab sehr übersichtliche Chromatogramme; die Molekulargewichte der erhaltenen Spezies stimmten mit triazolhaltigen oder nicht umgesetzten alkinfunktionalisierten Basen überein. Die Kohlenhydrat-modifizierten DNAs wurden durch eine kurze Behandlung mit

Tollens-Reagens selektiv mit Ag<sup>0</sup> metalliert, was potenziell leitfähige DNA-Nanodrähte lieferte.<sup>[50]</sup> Auf ähnliche Weise wurden gemischte Ag-Au-DNA-Nanodrähte<sup>[51]</sup> und Ketten von Au-Nanopartikeln auf künstlicher DNA erhalten.<sup>[52]</sup> Dieselbe Arbeitsgruppe kombinierte PCR und CuAAC in der Folge auch mit einer Nitriloxid-Alken-Cycloaddition zur selektiven doppelten Funktionalisierung langer DNA-Ketten.<sup>[53]</sup> Carell, Bein und Mitarbeiter erhielten außerdem DNA-basierte molekulare Ventile für temperaturgesteuerte Freisetzungsprozesse, indem sie Doppelstrang-ODNs mithilfe von CuAAC auf mesoporösen kolloidalen Siliciumoxid-nanopartikeln aufbrachten.<sup>[54]</sup>

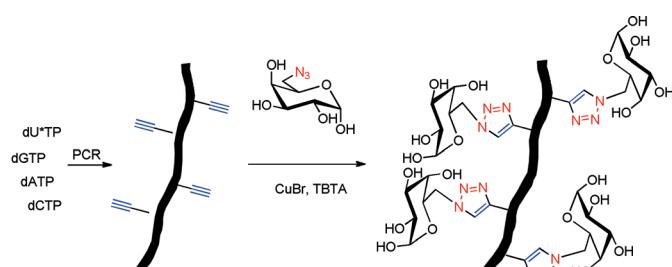
Browns Gruppe hat THPTA als Alternative für TBTA in der Funktionalisierung von Nucleinsäuren getestet,<sup>[31, 55–57]</sup> weil die ausreichende Wasserlöslichkeit dieses Liganden die organischen Cosolventien überflüssig macht, ohne die Anwendungen mit TBTA nicht auskommen. Wie bei der Modifizierung von Proteinen muss mindestens ein fünffacher Überschuss an Ligand bezüglich Cu<sup>I</sup> eingesetzt werden, um die oxidative Zersetzung durch ROS auf ein Minimum zu reduzieren. Mit diesem Ansatz wurden effiziente CuAAC-Verfahren für die templatvermittelte intermolekulare Ligation von ODN-Strängen<sup>[31]</sup> und die Vernetzung von DNA-Strängen entwickelt.<sup>[56]</sup> Außerdem konnten cyclische DNA-Doppelstränge ausgehend von ODN-Haarnadeln erhalten werden,<sup>[57]</sup> und es gelang die templatfreie intramolekulare Cyclisierung eines ODN-Einzelstrangs, der anschließend als Templat zur Herstellung eines Doppelstrang-DNA-Catenans diente (Schema 5).<sup>[31]</sup> Andere Forschergruppen haben Cu-



**Schema 5.** Bildung eines Doppelstrang-DNA-Catenans durch sequenzielle direkte und templatvermittelte Cyclisierung von ODNs (nach Lit. [31], Wiedergabe mit Genehmigung).

AACs mit THPTA zur effizienten Oberflächenmodifizierung superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel mit ODNs<sup>[58]</sup> zur Herstellung von circulären Nanostrukturen aus sechs DNA-Strängen<sup>[59]</sup> und zur Kupplung von Dendrimeren an DNA-Templaten angewendet.<sup>[60]</sup>

Anders als die oft genutzten Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden wurde BPDS nur selten in CuACCs an Nucleinsäuren getestet, was an der großen Sauerstoffempfindlichkeit des BPDS/Cu<sup>I</sup>-Systems liegen könnte. Hier sind Resultate von Gothelf und Mitarbeitern zur Vernetzung von ODN-Strängen in DNA-Doppelstränge und -Tripelstränge erwähnenswert.<sup>[61]</sup> Sie nutzten eine CuAAC unter Steuerung durch niedermolekulare Verbindungen und fanden heraus, dass BPDS die ODN-Zersetzung kaum verhindern kann (DPAGE- und HPLC-Analyse), während die Vernetzung in Gegenwart von THPTA in sehr guten Ausbeuten (80–90 %) bei nur geringfügiger ODN-Zersetzung gelang.



**Schema 4.** Herstellung funktionalisierter DNA-Ketten nach dem PCR-CuAAC-Protokoll. dATP: Desoxyadenosintriphosphat, dCTP: Desoxy-cytidintriphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dU\*TP: alkyliertes Pyrimidintriphosphat (nach Lit. [49a], Wiedergabe mit Genehmigung).

## 4. Biokonjugation von Polysacchariden durch CuAAC

CuAAC wurde auch in der selektiven Funktionalisierung von Cyclodextrinen sowie Oligo- und Polysacchariden eingesetzt. Ziele waren dabei die Herstellung von Hydrogelen,<sup>[62]</sup> Filmen,<sup>[63]</sup> MRI-Kontrastmitteln<sup>[64]</sup> und Nanostrukturen für den Transport von Wirkstoffen und Genen.<sup>[65]</sup> Funktionalisierte Polysaccharide wurden zudem als Trägerkatalysatoren für die CuAAC ins Gespräch gebracht.<sup>[66]</sup> Bei all diesen Anwendungen wurden mögliche Schädigungen des Polysaccharid-Rückgrats durch Cu jedoch kaum diskutiert. Dies ist insofern erstaunlich, als Übergangsmetallionen Polysaccharide bekanntermaßen angreifen<sup>[10]</sup> und sogar zu ihrer gezielten Depolymerisation genutzt werden können.<sup>[67]</sup> Überdies werden Polysaccharide als Radikalfänger eingesetzt, um DNA vor oxidativer Schädigung zu schützen.<sup>[68]</sup>

Die Gruppe um Fernandez-Megia und Riguera beschrieb als erste die Depolymerisation von Polysacchariden unter den Bedingungen einer CuAAC. Bei Studien zu PEG-gepfropftem Chitosan (CS-g-PEG) als Wirkstoff-Transporter über die Blut-Hirn-Schranke erkannten sie Einschränkungen der CuAAC-Funktionalisierung von CS-g-PEG-N<sub>3</sub> (mit Azidgruppen an den Enden der PEG-Blöcke).<sup>[69]</sup> Analysen mit Größenausschlusschromatographie ergaben, dass quantitative Umsätze mit beträchtlicher Depolymerisation des CS-Rückgrats einhergingen. Diese Depolymerisation wurde auf ·OH-Radikale zurückgeführt, die auch im Reaktionsmedium nachgewiesen wurden. Unter ihrer Einwirkung werden glycosidische Bindungen gespalten, was das Molekulargewicht drastisch senkt. Dieses Phänomen wurde in H<sub>2</sub>O für verschiedene Polysaccharide allgemein beobachtet, wobei die Abnahme des Molekulargewichts und die Fähigkeit der Polysaccharide, Cu zu komplexieren, parallel verliefen [Polysaccharid ( $M_w$ -Abnahme in %): Mannan (3%), Dextran (38%), CS (95%), Hyaluronsäure (> 99%)]. Die Schädigung war demnach umso stärker, je näher am Polymerrückgrat die kurzlebigen ·OH-Radikale gebildet wurden. Wegen der starken Depolymerisationsneigung von CS und des hohen Cu-Gehalts der erhaltenen Konjugate (die sich wegen der Cytoxizität von Cu kaum für biomedizinische Anwendungen eigneten) prüften die Autoren die SPAAC als eine mögliche Cu-freie Alternative für die Funktionalisierung ihrer CS-g-PEG-Nanopartikel (siehe Abschnitt 5).<sup>[69]</sup>

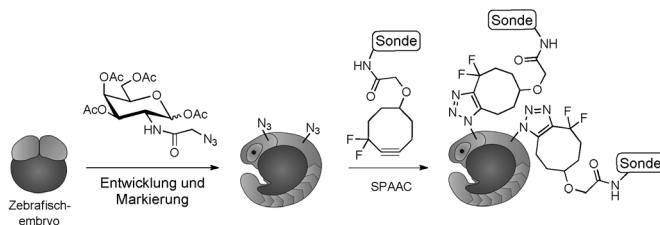
Die Gruppen um Makuska und Li machten beim Ppropfen von CS an PEG (CS-g-PEG)<sup>[70]</sup> und von Poly[(2-dimethylamino)ethylmethacrylat] an Poly(N-isopropylacrylamid) [CS-(g-PDMAEMA)-g-PNIPAM]<sup>[71]</sup> ähnliche Erfahrungen. Übereinstimmend mit dem erwähnten Zusammenhang zwischen Cu-Komplexierung und Zersetzung wurde für weniger stark aminierte CS-Proben ein geringeres Ausmaß an Depolymerisation beobachtet. Seppala und Mitarbeiter beschrieben die Depolymerisation von Dextran-g-PEG beim Ppropfen durch CuAAC.<sup>[72]</sup> Hier führten Versuche, die Ppropfreaktion durch eine längere Reaktionsdauer zu verbessern (24 h), zu Copolymeren mit geringerer hydrodynamischer Größe, was als das Resultat einer oxidativen Zersetzung interpretiert wurde. Ebenso wie für Proteine und Nucleinsäuren sollte sich auch bei der CuAAC von Polysacchariden

durch den Einsatz optimierter Protokolle die oxidative Schädigung in Grenzen halten lassen.

## 5. SPAAC – eine Cu-freie Klick-Reaktion für Biomakromoleküle

Die CuAAC bietet sich wohl für die effiziente Funktionalisierung von Biomakromolekülen in vitro an, doch Nebenreaktionen des Cu-Katalysators haben ihre Anwendung in vivo stark eingeschränkt. Zwar wurde die CuAAC verwendet, um Bakterien<sup>[73]</sup> und Säugerzellen zu markieren,<sup>[74]</sup> aber die Gegenwart von Cu wirkte sich oft nachteilig auf lebende Zellen aus. Daher wurden spezielle CuAAC-Biokonjugationsprotokolle entwickelt, um solche Schäden möglichst gering zu halten.<sup>[37,20]</sup>

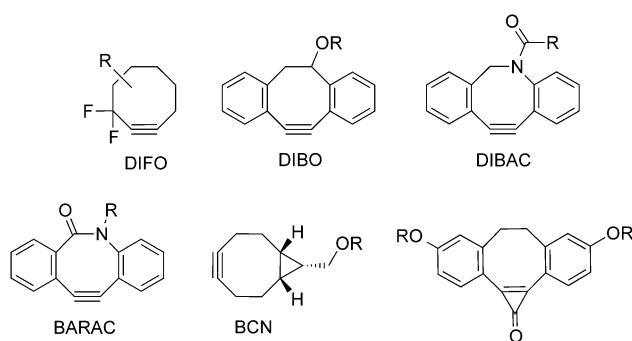
Eine Alternative sind Cu-freie AACs, die keine cytotoxischen Metalle und Additive benötigen. Die Gruppe um Bertozzi nutzte die Ringspannung von Cyclooctinen, um die Aktivierungsbarriere für eine AAC effektiv zu verringern und dadurch die Notwendigkeit von Metallkatalysatoren zu umgehen (Schema 1c).<sup>[7]</sup> Diese ringspannungsinduzierte AAC, oder SPAAC, wurde von ihnen im Zusammenhang einer bioorthogonalen Strategie zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und Zelloberflächen-Glycanen in lebenden Zellen und Organismen wie Zebrafischen und Mäusen angewendet (Schema 6).<sup>[7,75,76]</sup> Das einfache und hoch orthogo-



**Schema 6.** Metabolitenmarkierung und SPAAC für die nichtinvasive Bildgebung von Zelloberflächen-Glycanen in der Entwicklung von Zebrafischen (nach Lit. [75c], Wiedergabe mit Genehmigung).

nale<sup>[77]</sup> SPAAC-Verfahren wurde schnell von anderen Gruppen übernommen, die damit nicht nur dynamische Prozesse von Biomolekülen in lebenden Organismen studierten, sondern es auch als leistungsfähige Kupplungsmethode in Nanotechnologie, Material- und Polymerwissenschaften einführten.<sup>[78,79]</sup>

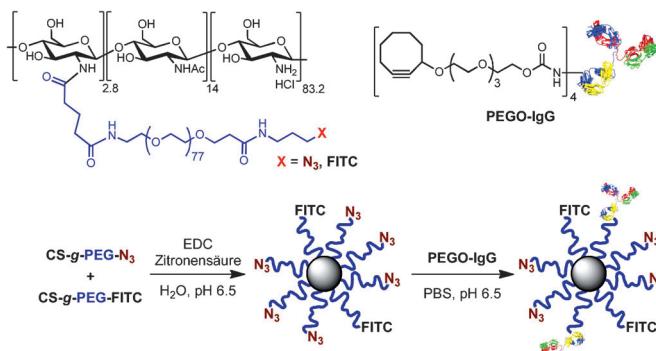
Die Optimierung der Reaktivität der Cyclooctine und die Entwicklung effizienterer Synthesewege waren Ziele der Gruppen um Bertozzi [Difluorocyclooctine (DIFO) und Biarylazacyclooctinone (BARAC)],<sup>[75,80]</sup> Boons [Dibenzocyclooctine (DIBO)]<sup>[81]</sup> sowie van Hest und van Delft [Dibenzazacyclooctine (DIBAC) und Bicyclo[6.1.0]nonine (BCN)]<sup>[82,83]</sup> (Abbildung 6). Dank der verbesserten Reaktivität dieser aktivierten Reagentien gegenüber nichtfunktionalisiertem Cyclooctin, bedingt durch elektronenziehende Gruppen und eine größere Ringspannung, konnten vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden wie in der CuAAC ohne Ligandenzusatz. Boons, Popik und Mit-



**Abbildung 6.** Aktivierte Cyclooctin-Derivate für SPAAC-Biokonjugationen.

arbeiten entwickelten auch eine Vorstufe des reaktiven DIBO, in der die Cyclooctin-Dreifachbindung als Cyclopropanon maskiert ist (Abbildung 6); mithilfe dieses Reagenzes konnten sie eine SPAAC durch UV-Bestrahlung bei ca. 350 nm photochemisch auslösen.<sup>[84]</sup>

Die SPAAC hat sich als effizientes Biokonjugationsverfahren *in vitro* bewährt, wenn der Zusatz von Cu für eine CuAAC nicht möglich war. Die Gruppe um Fernandez-Megia und Riguera nutzte eine SPAAC alternativ zur CuAAC, um bei der orthogonalen Funktionalisierung von Polysacchariden und Polysaccharid-basierten Nanostrukturen eine Depolymerisation und Kontaminierung mit Cu zu vermeiden (siehe Abschnitt 4).<sup>[69]</sup> Die Kupplung vernetzter CS-g-PEG-N<sub>3</sub>-Nanopartikel mit einem Cyclooctinderivat von Anti-BSA-Immunglobulin G (IgG) verlief quantitativ unter physiologischen Bedingungen (Abbildung 7).



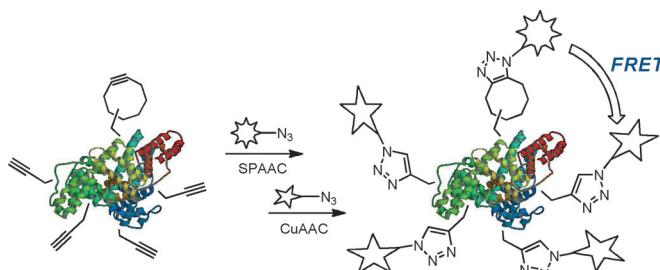
**Abbildung 7.** Herstellung von CS-g-PEG-Immun-Nanopartikeln durch SPAAC (nach Lit. [69], Wiedergabe mit Genehmigung).

Die Vorteile von SPAAC bei der Funktionalisierung von Proteinen und Bionanopartikeln wurden kürzlich anhand einiger Beispiele aufgezeigt. So nutzte Yins Gruppe eine SPAAC, um den *Escherichia coli*-Bakteriophagen M13 zu markieren, dessen Infektiösität schon bei Kontakt mit mikromolaren Cu-Konzentrationen drastisch abnahm.<sup>[85]</sup> Van Hest, van Delft und Mitarbeiter setzten DIBAC in einer PEGylierung von Proteinen ein.<sup>[82]</sup> Der für das Lösungsmittel zugängliche Azidohomoalanin-Rest in AHA-CalB war nach einer dreistündigen Behandlung mit DIBAC-PEG unter

physiologischen Bedingungen quantitativ PEGyliert, während eine CuAAC nur eine unvollständige Funktionalisierung bewirkte.<sup>[27]</sup> Weitere interessante Beispiele illustrieren die Vorteile von SPAAC bei der Biokonjugation von Nucleinsäuren<sup>[86]</sup> und Quantenpunkten (QDs).<sup>[87]</sup> Auf die Schädigung von Nucleinsäuren durch Cu hatten wir bereits hingewiesen; kürzlich wurde aber auch berichtet, dass sich die Lumineszenz von QDs in Gegenwart von Cu-Ionen drastisch ändern kann.

Die vielseitige SPAAC hat längst auch jenseits der Biokonjugation Anwendungen gefunden, in denen der Einsatz von Metallkatalysatoren und Additive vermieden werden soll oder ihre Entfernung problematisch ist.<sup>[88]</sup> Turro und Mitarbeiter setzten die SPAAC zur In-situ-Vernetzung von photochemisch abbaubaren Sternpolymeren mit Azid-Endgruppen ein, die nach einer CuAAC einer gründlichen Waschprozedur unterzogen werden müssten.<sup>[89]</sup> In ähnlicher Weise erhielten Anseth und Mitarbeiter durch eine SPAAC enzymatisch abbaubare Hydrogele als dreidimensionale Zellkulturerüste.<sup>[90]</sup> In Gegenwart von 3T3-Fibroblasten wurde durch Vernetzen eines sternförmigen PEG-Tetraazids mit einem biologisch abbaubaren RGD-Peptid, das zwei DIFO-Funktionen trägt, ein PEG-basiertes Polymernetzwerk erzeugt. Zusätzlich wurden C-C-Doppelbindungen am Peptidrückgrat befestigt, um die Bildung eines definierten Musters auf dem Hydrogel durch eine photochemische Thiol-En-Addition zu ermöglichen.

Schließlich beruhen einige interessante Anwendungen auf den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen von CuAAC und SPAAC. Kele, Wolfbeis und Mitarbeiter beschrieben die doppelte Markierung von Proteinen (BSA) und Siliciumoxidnanopartikeln bei der Herstellung von FRET-Nanosonden durch eine Folge orthogonaler Schritte (Schema 7).<sup>[91]</sup> Fluoreszenzmarkierte Siliciumoxidnanopartikel, konjugiert mit einem Substrat, das durch das Enzym für den FRET aktiviert wird, wurden durch eine Folge von SPAAC und CuAAC erhalten und eingesetzt, um Konzentrationen von Matrix-Metalloproteinase II, die als wichtiger Tumormarker angesehen wird, im nanomolaren Bereich zu bestimmen.<sup>[92]</sup>



**Schema 7.** Doppelte Markierung von Nanosonden durch eine SPAAC-CuAAC-Sequenz.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen Jahren wurde die Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) als leistungsfähige Biokonjugationsmethode für Proteine, Nucleinsäuren und Poly-

saccharide etabliert. Die einfach ausführbare und zuverlässige CuAAC hat sich als universelles Verfahren in vielen Forschungsfeldern durchgesetzt – trotz einiger Nachteile durch den erforderlichen Cu-Zusatz. Cu spielt eine Rolle bei der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Biomakromoleküle strukturell schädigen können (Stichwort „oxidativer Stress“), und Cu-Verunreinigungen in den erhaltenen Konjugaten können für biologische Anwendungen problematisch sein. Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden Katalysatorsysteme mit Chelatliganden eingesetzt, die die Reaktion beschleunigen und die Oxidationsstufe Cu<sup>1</sup> stabilisieren. Eine weitere Alternative ist die ringspannungsvermittelte SPAAC, die ursprünglich für die Untersuchung dynamischer Prozesse von Biomolekülen in lebenden Organismen entwickelt wurde. Dieser Biokonjugationsprozess ist effektiv für In-vitro-Anwendungen, in denen kein Cu-Katalysator verwendet werden kann. Durch die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen von CuAAC und SPAAC ließen sich Kombinationen der beiden Prozesse entwerfen, mit deren Hilfe die eine orthogonale doppelte Markierung gelingt.

Diese Arbeit wurde durch das Spanische Ministerium für Wissenschaft und Innovation (CTQ2009-10963 und CTQ2009-14146-C02-02) und die Xunta de Galicia (10CSA209021PR) finanziell unterstützt.

Eingegangen am 9. Februar 2011

Online veröffentlicht am 17. August 2011

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Weinheim

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [2] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565.
- [3] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [4] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [5] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2250; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210.
- [6] Ausgewählte Übersichten zur CuAAC: a) R. K. Iha, K. L. Wooley, A. M. Nyström, D. J. Burke, M. J. Kade, C. J. Hawker, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5620; b) M. van Dijk, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2001; c) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952; d) M. Meldal, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1016; e) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7; f) J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018; g) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- [7] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- [8] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192.
- [9] G. J. Brewer, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 319.
- [10] a) G. Tabbì, S. C. Fry, R. P. Bonomo, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *84*, 179; b) S. C. Fry, *Biochem. J.* **1998**, *332*, 507.
- [11] J. E. Biaglow, Y. Manevich, F. Uckun, K. D. Held, *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *22*, 1129.
- [12] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 1.
- [13] a) D. Bar-Or, L. T. Rael, E. P. Lau, N. K. R. Rao, G. W. Thomas, J. V. Winkler, R. L. Yukl, R. G. Kingston, C. G. Curtis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 856; b) L. Mi, A. D. Zuberbühler, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1679; c) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1.
- [14] a) E. R. Stadtman, *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 1250; b) E. R. Stadtman, B. S. Berlett, *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 225.
- [15] A. Kumar, K. Li, C. Cai, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3186.
- [16] a) T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, K. L. Larsen, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1710; b) D. Cummins, C. J. Duxbury, P. J. L. M. Quaedflieg, P. C. M. M. Magusin, C. E. Koning, A. Heise, *Soft Matter* **2009**, *5*, 804; c) C. J. Duxbury, D. Cummins, A. Heise, *J. Polym. Sci. Part A* **2009**, *47*, 3795; d) M. Malkoch, K. Schleicher, E. Drockenmüller, C. J. Hawker, T. P. Russell, P. Wu, V. V. Fokin, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3663.
- [17] a) T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853; b) J. E. Hein, L. B. Krasnova, M. Iwasaki, V. V. Fokin, *Org. Synth.* **2011**, *88*, 238.
- [18] W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9152.
- [19] a) S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570; b) V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696.
- [20] a) D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893 b) C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klavansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, DOI: 10.1002/ange.201101817; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, DOI: 10.1002/anie.201101817.
- [21] S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572.
- [22] D. E. Prasuhn, Jr., R. M. Yeh, A. Obenaus, M. Manchester, M. G. Finn, *Chem. Commun.* **2007**, 1269.
- [23] S. S. Gupta, K. S. Raja, E. Kaltgrad, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Commun.* **2005**, 4315.
- [24] E. Kaltgrad, S. Sen Gupta, S. Punna, C.-Y. Huang, A. Chang, C.-H. Wong, M. G. Finn, O. Blixt, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1455.
- [25] P. S. Banerjee, P. Ostapchuk, P. Hearing, I. Carrico, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13615.
- [26] Q. Zeng, T. Li, B. Cash, S. Li, F. Xie, Q. Wang, *Chem. Commun.* **2007**, 1453.
- [27] S. Schoffelen, M. H. L. Lamberman, M. B. von Eldijk, J. C. M. van Hest, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1127.
- [28] N. K. Devaraj, P. H. Dinolfo, C. E. D. Chidsey, J. P. Collman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1794.
- [29] V. Hong, A. K. Udit, R. A. Evans, M. G. Finn, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1481.
- [30] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879.
- [31] R. Kumar, A. H. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6859.
- [32] Die allgemeine experimentelle Vorschrift erfordert 0.10 mM CuSO<sub>4</sub>, 0.50 mM THPTA, 5 mM Natriumascorbat, 5 mM Aminoguanidin, eine Konzentration von 2 µm oder mehr für Azid- oder Alkingruppen auf dem Biomakromolekül und einem mindestens doppelten Überschuss an Alkin- bzw. Azid-Kupplungspartner.
- [33] D. Banerjee, A. P. Liu, N. R. Voss, S. L. Schmid, M. G. Finn, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1273.
- [34] N. F. Steinmetz, V. Hong, E. D. Spoerke, P. Lu, K. Breitenkamp, M. G. Finn, M. Manchester, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17093.
- [35] P. Cigler, A. K. R. Lytton-Jean, D. G. Anderson, M. G. Finn, S. Y. Park, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 918.
- [36] J. Lucon, M. J. Abedin, M. Uchida, L. Liepold, C. C. Jolley, M. Young, T. Douglas, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 264.

- [37] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912.
- [38] a) A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388; b) P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350.
- [39] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609.
- [40] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmiedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1997.
- [41] Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3143.
- [42] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109.
- [43] a) M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545; b) Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370.
- [44] a) G. Pourceau, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1218; b) J. Lietard, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191; c) C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevrolot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700.
- [45] I. Géci, V. V. Filichev, E. B. Pedersen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6379.
- [46] R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2141.
- [47] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [48] N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600.
- [49] a) J. Gierlich, K. Gutsmiedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486; b) C. T. Wirges, P. M. E. Gramlich, K. Gutsmiedl, J. Gierlich, G. A. Burley, T. Carell, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1159.
- [50] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398.
- [51] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, *3*, 1049.
- [52] M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169.
- [53] K. Gutsmiedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6877.
- [54] A. Schlossbauer, S. Warncke, P. M. E. Gramlich, J. Kecht, A. Manetto, T. Carell, T. Bein, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4842; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4734.
- [55] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15329.
- [56] P. Kočalka, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1280.
- [57] a) A. H. El-Sagheer, R. Kumar, S. Findlow, J. M. Werner, A. N. Lane, T. Brown, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 50; b) A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 367.
- [58] J. I. Cutler, D. Zheng, X. Xu, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1477.
- [59] E. P. Lundberg, A. H. El-Sagheer, P. Kocalka, L. M. Wilhelmsen, T. Brown, B. Nordén, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3714.
- [60] H. Liu, T. Tørring, M. Dong, C. B. Rosen, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18054.
- [61] M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbaek, K. V. Gothelf, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 50.
- [62] a) D. Mortisen, M. Peroglio, M. Alini, D. Eglin, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1261; b) V. Crescenzi, L. Cornelio, C. Di Meo, S. Nardecchia, R. Lamanna, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1844.
- [63] B. G. De Geest, W. Van Camp, F. E. Du Prez, S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1111.
- [64] a) Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6662; b) J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1505.
- [65] a) J. Deng, Y. Zhou, B. Xu, K. Mai, Y. Deng, L.-M. Zhang, *Biomacromolecules* **2011**, DOI: 10.1021/bm101303f; b) C. Schatz, S. Louguet, J.-F. Le Meins, S. Lecommandoux, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2610; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2572; c) S. Srinivasachari, T. M. Reineke, *Biomaterials* **2009**, *30*, 928; d) Y. Gao, Z. Zhang, L. Chen, W. Gu, Y. Li, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2175; e) B. G. De Geest, W. Van Camp, F. E. Du Prez, S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Chem. Commun.* **2008**, *190*; f) M. Ikeda, T. Hasegawa, M. Numata, K. Sugikawa, K. Sakurai, M. Fujiki, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3979; g) T. Hasegawa, M. Numata, S. Okumura, T. Kimura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2404.
- [66] M. Chtchigrovsky, A. Primo, P. Gonzalez, K. Molvinger, M. Robitzer, F. Quignard, F. Taran, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5916.
- [67] K. L. B. Chang, M.-C. Tai, F.-H. Cheng, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4845.
- [68] K. V. Harish Prashanth, S. M. Dharmesh, K. S. Jagannatha Rao, R. N. Tharanathan, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 190.
- [69] E. Lallana, E. Fernandez-Megia, R. Riguera, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5748.
- [70] R. Kulbokaite, G. Ciuta, M. Netopilik, R. Makuska, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 771.
- [71] H. Bao, L. Li, L. H. Gan, Y. Ping, J. Li, P. Ravi, *Macromolecules* **2010**, *43*, 5679.
- [72] N. Pahimanolis, A.-H. Vesterinen, J. Rich, J. Seppala, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 78.
- [73] Beispiele: a) A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598; b) A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164.
- [74] Beispiele: a) F. Chehrehasa, A. C. B. Meedeniya, P. Dwyer, G. Abrahamsen, A. Mackay-Sim, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *177*, 122; b) P. M. Clark, J. F. Dweck, D. E. Mason, C. R. Hart, S. B. Buck, E. C. Peters, B. J. Agnew, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11576; c) M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12371.
- [75] a) J. M. Baskin, K. W. Dehnert, S. T. Laughlin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10360; b) P. V. Chang, D. H. Dube, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9516; c) S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664; d) 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.
- [76] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821.
- [77] Cyclooctine reagieren in vitro kaum mit Thiolen, Aminen und Alkoholen, doch in einem jüngeren Beitrag über die Markierung von Biomolekülen in lebenden Mäusen durch SPAAC fanden Bertozzi und Mitarbeiter, dass Cyclooctine auch Serumalbumin markieren (Lit. [76]). Die Autoren schlugen vor, dass eine unspezifische Wechselwirkung zwischen hydrophober Cyclooctin-Einheit und Protein die kovalente Verknüpfung mit Cystein- oder anderen nucleophilen Resten erleichtern könnte. Weitere Ergebnisse hierzu könnten dabei helfen, die Orthogonalität von Cyclooctinen einzuschätzen. Siehe auch: B. D. Fairbanks, E. A. Sims, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 4113.
- [78] Ausgewählte Übersichten zur SPAAC: a) J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *Aldrichimica Acta* **2010**, *43*, 15; b) M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168; c) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272; d) J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2212; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2182.

- [79] a) S. V. Orski, A. A. Poloukhine, S. Arumugam, L. Mao, V. V. Popik, J. Locklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024; b) K. E. Beatty, J. D. Fisk, B. P. Smart, Y. Y. Lu, J. Szychowski, M. J. Hangauer, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2092; c) A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498; d) L. A. Canalle, S. S. van Berkel, L. T. de Haan, J. C. M. van Hest, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3464.
- [80] a) J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688; b) J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486; c) N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644.
- [81] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253.
- [82] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97.
- [83] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422.
- [84] A. A. Poloukhine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769.
- [85] Y. Zou, J. Yin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5664.
- [86] P. van Delft, N. J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H. S. Overkleef, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5486.
- [87] A. Bernardin, A. L. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. o. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583.
- [88] Beispiele, in denen eine Cu-Verunreinigung von Dendrimeren und RNA, die nach CuAAC auftritt, durch SPAAC vermieden wird: a) C. Ornelas, J. Broichhagen, M. Weck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3923; b) K. N. Jayaprakash, C. G. Peng, D. Butler, J. P. Varghese, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5410.
- [89] J. A. Johnson, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, J. T. Koberstein, N. J. Turro, *Chem. Commun.* **2008**, 3064.
- [90] a) C. A. DeForest, E. A. Sims, K. S. Anseth, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4783; b) C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 659.
- [91] P. Kele, G. Mező, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 344. Siehe auch: P. A. Ledin, F. Friscourt, J. Guo, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 839.
- [92] D. E. Achatz, G. Mező, P. Kele, O. S. Wolfbeis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2316.