

VÝVOJ A POUŽITÍ BIOORTOGONÁLNÍCH REAKCÍ PRO ZOBRAZOVÁNÍ A AKTIVACI LÉČIV

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

MILAN VRÁBEL a VERONIKA ŠLACHTOVÁ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika
vrabel@uochb.cas.cz

Došlo 26.10.23, přijato 3.1.24.

Chemické transformace kompatibilní s biologickými systémy slouží jako neocenitelné nástroje pro zkoumání biomolekul, sloučenin léčiv a biologických procesů v jejich přirozeném prostředí. Složité prostředí živých organismů vyžaduje, aby tyto reakce byly vysoce selektivní a účinné, což představuje pro oblast organické chemie obrovskou výzvu. V poslední době se objevila řada chemických reakcí, které tyto podmínky splňují, a poskytují proto výzkumným pracovníkům rozmanitou sadu nástrojů. Tento rukopis představuje komplexní přehled současných bioortogonálních reakcí s důrazem na jejich aplikace v zobrazování, diagnostice a medicíně.

Klíčová slova: click chemie, bioortogonální reakce, zobrazování, fluorescenční značení, proléčiva

Obsah

1. Úvod
2. Z historie bioortogonálních reakcí
3. Využití bioortogonálních reakcí v zobrazování
4. Využití bioortogonálních reakcí pro aktivaci léčiv
5. Vývoj nových bioortogonálních reakcí
6. Závěr

1. Úvod

Bioortogonální reakce, charakteristické svou schopností probíhat selektivně v komplexním prostředí živých systémů, otevřely nové možnosti pro manipulaci a studium biomolekul. Tato dynamicky se rozvíjející oblast moderní chemie má hluboký dopad na různá odvětví a přispívá k vývoji pokročilých zobrazovacích sond, inovativních diagnostických nástrojů a nových terapeutik. Udělení Nobelovy ceny za chemii v roce 2022 Carolyn Bertozziové, Mortenu Meldalovi a Barrymu Sharplessovi „za vývoj click chemie a bioortogonální chemie“ potvrzuje obrovský potenciál tohoto odvětví. Vývoj bioortogonálních reakcí je komplexní proces, přičemž nejdůležitější roli v něm sehrávají samotné reagenty, které se reakce účastní. Tyto musí být ne jenom dostatečně reaktivní, ale i dostatečně stabilní a selektivní vůči druhé funkční skupině. Navíc tyto reagenty nesmí být toxické za podmínek použití, a hlavně vůči organismu, ve kterém se používají. Všechny tyto podmínky dělají z vývoje bioortogonálních reakcí a činidel náročný proces, který však může vést k novým nástrojům pro širokou škálu aplikací.

Cílem tohoto přehledového článku je představit současné poznatky o bioortogonálních reakcích a jejich použití zejména při zobrazování, diagnostice a v medicíně.

2. Z historie bioortogonálních reakcí

Bioortogonální reakce jsou chemické reakce známé z učebnic organické chemie. Nicméně ne všechny reakce v učebnicích organické chemie jsou bioortogonální. Jako bioortogonální se definuje chemická reakce, která neinteraguje ani nezasahuje do biologického systému, tudíž je s biologickými systémy kompatibilní¹. Za vůbec první bioortogonální reakci se považuje tzv. Staudingerova ligace, vyvinutá a popsána v roce 2000 (cit.²), která byla použita pro značení azidem modifikovaných cukerných molekul na povrchu živých buněk pomocí fosfinových derivátů obsahujících elektrofilní past (Schéma 1).

Dalším důležitým milníkem vývoje reakcí použitelných na biologických systémech bylo zavedení pojmu „click chemie“ Barry Sharplessem v roce 2001 (cit.³). Jako click reakce se označují reakce, které jsou snadné na provedení, probíhají v různých rozpouštědlech (včetně vody) bez zásadního vlivu dalších faktorů (jako např. pH), generují minimální a neškodné vedlejší produkty a vyznačují se vysokou termodynamickou hnací silou, která je rychle a nevratně pohání k tvorbě produktů ve vysokém výtěžku, s vysokou reakční rychlostí a specificitou (v některých případech s regio- i stereo-specificitou). Za nejznámější click reakci lze považovat mědi katalyzovanou azido-alkynovou cykloadici (z angl. copper-catalyzed azide

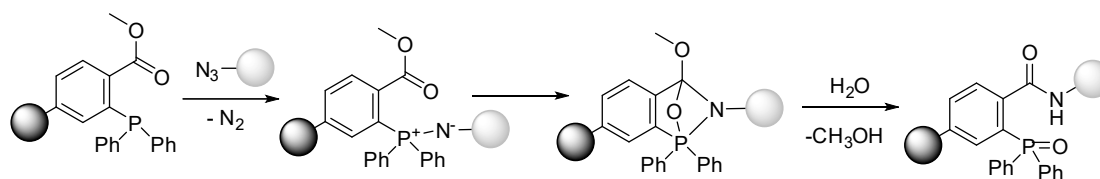


Schéma 1. Staudingerova ligace

alkyne cycloaddition, CuAAC, Schéma 2a)^{4,5}. CuAAC nachází využití v různých oblastech, jako jsou modifikace biomolekul, materiálová nebo medicínská chemie^{6–8}. Nicméně, bioortogonalita této reakce je kompromitována toxicitou měďných solí, které se při reakci využívají jako katalyzátor⁹. Tudiž ne každá click reakce je bioortogonální. Přes různé snahy kontrolovat toxicitu Cu^I iontů, např. použitím vhodných komplexujících ligandů¹⁰, zůstává použití této reakce na živých systémech omezené¹¹.

Možným řešením tohoto problému se ukázalo být použití pnutí kruhu jako hnací síly reakce alkyňů s azidy místo katalýzy. Konkrétně se jedná o reakci cykloalkynů s azidy, při které dochází k uvolnění napětí cykloalkynového kruhu za vzniku triazolového produktu jako směsi dvou regioisomerů¹². Tato reakce je známá jako „strain-promoted azide-alkyne cycloaddition“ (SPAAC, Schéma 2b) a patří mezi nejpoužívanější bioortogonální reakce vůbec. Obměnou struktury cykloalkynů lze modulovat

rychlost reakce a další vlastnosti těchto sloučenin, jako jsou rozpustnost, lipofilicita nebo stabilita^{13,14}.

Využití principu uvolnění pnutí molekul při reakci dnes patří mezi nejčastěji využívaný způsob navýšení reaktivity bioortogonálních činidel. Důvodem potřeby vysokých reakčních rychlostí je používání bioortogonálních činidel, resp. provádění těchto reakcí v živých systémech za nízkých koncentrací (důležitou roli zde hraje toxicita látek ale i rozpustnost některých sloučenin). Proto je potřeba mít reakci s dostatečnou hnací silou. Mezi nejpoužívanější bioortogonální reakce dnes patří reakce 1,2,4,5-tetrazinů (Tz) s napjatými systémy, jako jsou cykloalkyny a obzvláště pak *trans*-cykloalkeny (TCO) (Schéma 3)^{15,16}.

Rychlostní konstanty této Dielskovy-Alderovy reakce s inverzními elektronovými nároky mohou ve vodném prostředí dosahovat hodnot enzymatických reakcí a jsou v řádech stovek tisíc až milionů M⁻¹ s⁻¹ (cit.^{17,18}). Tato

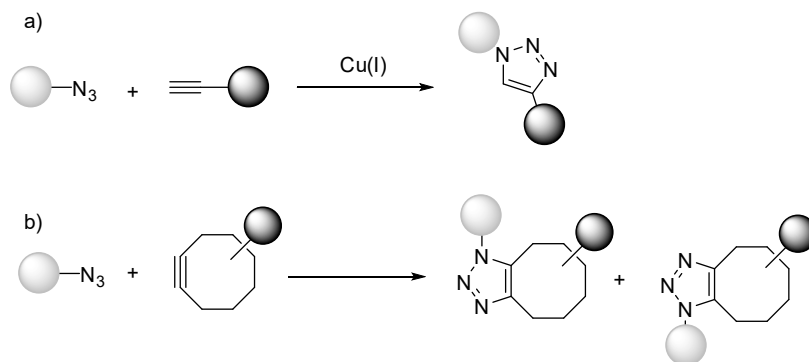
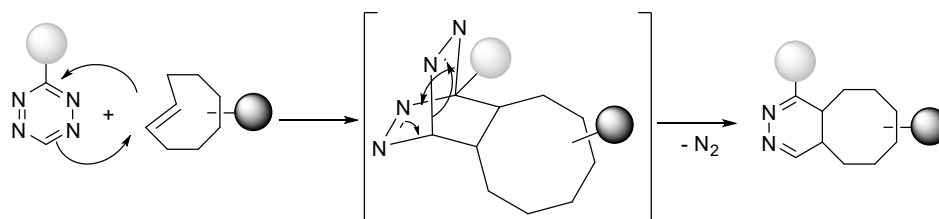


Schéma 2. a) Měď katalyzovaná cykloadice alkyňů a azidů (CuAAC); b) Cykloadice podporovaná deformací kruhu (SPAAC)

Schéma 3. Dielskovy-Alderova reakce s inverzními elektronovými nároky (IEDDA) 1,2,4,5-tetrazinů s *trans*-cykloalkeny vedoucí k dihydropyridazinům

výjimečná reaktivita spojená s malou toxicitou derivátů Tz a TCO pak umožňuje použití reakce v živých organismech včetně prvních klinických studií na lidech^{19–21}. Mezi nejčastější oblasti použití patří zobrazování a medicína.

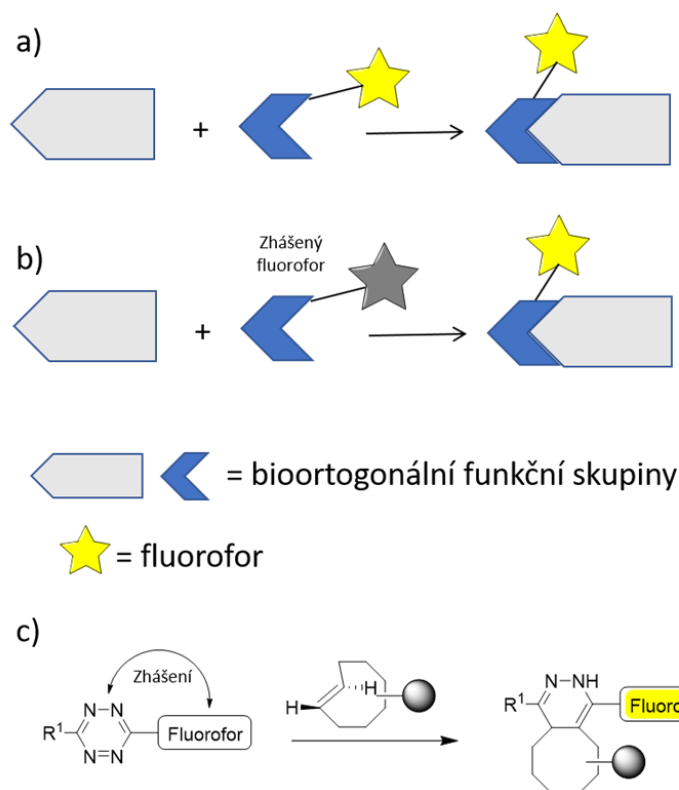
3. Využití bioortogonálních reakcí v zobrazování

Vizualizace biomolekul a biologických procesů v prostředí živých organismů je nedílnou součástí studia biologických systémů^{22,23}. Bioortogonální reakce umožňují značení biomolekul v jejich přirozeném prostředí^{24,25}. Tyto reakce umožňují vědcům zkoumat, zachycovat a pochopit molekulární interakce s nebývalou přesností. Od zavedení fluorescenčních značek až po vývoj různých zobrazovacích sond, bioortogonální chemie poskytuje výzkumníkům rozsáhlou sadu nástrojů, které jim umožňují lépe studovat a porozumět interakcím a procesům probíhajícím v živých organismech.

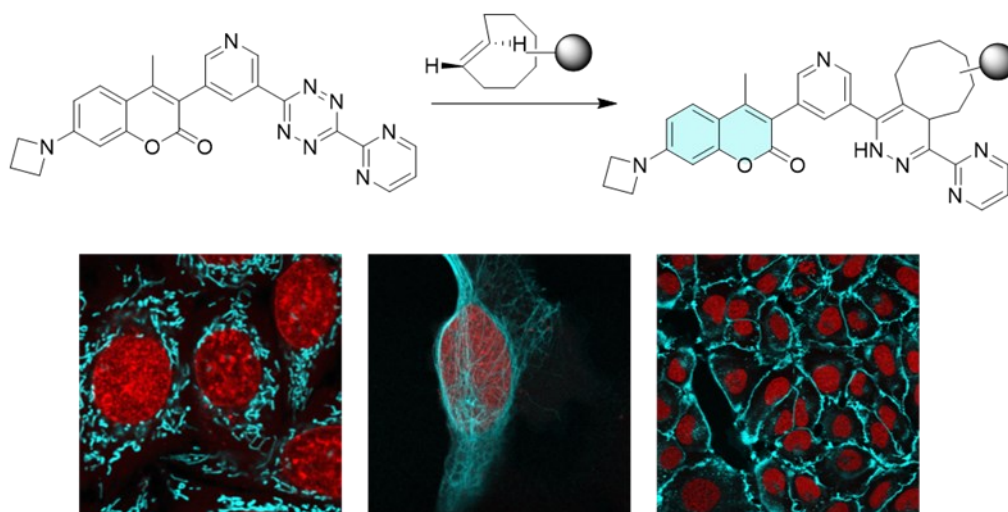
Nejběžnější způsob použití bioortogonálních reakcí při vizualizaci biomolekul je založen na připojení fluorescenční značky k biomolekule, která je předmětem studie a obsahuje druhou bioortogonální funkční skupinu²⁶. Zavedením jedné bioortogonální funkční skupiny do struktury biomolekuly, např. ve formě modifikované aminoky-

seliny, lze dosáhnout vysoké selektivity fluorescenčního značení (obr. 1a)²⁷.

Navíc, pokud buňka dokáže sama vyprodukovat takto upravenou biomolekulu, lze bioortogonální značení provádět přímo v živých buňkách přidáním druhé bioortogonální sloučeniny nesoucí fluorescenční značku. Tento způsob značení často vyžaduje zdlouhavou optimalizaci celého procesu. Problém spočívá zejména v potřebě odmytí přebytečné barvičky (druhého reagentu), aby se dosáhlo vysokého poměru signálu k šumu. Elegantní řešení tohoto problému nabízí tzv. fluorogenní reakce²⁸. Při těchto reakcích dochází k tvorbě fluorescenční značky až v průběhu reakce. To znamená, že ze dvou reagentů, které nejsou fluorescenční, vzniká fluorescenční produkt jejich vzájemnou reakcí (obr. 1b). Tímto odpadá potřeba odmytí nadbytečných reagentů, protože ty nejsou fluorescenční, a nezpůsobují navýšení signálu pozadí. Jako příklad fluorogenní reakce lze uvést reakci tetrazinů modifikovaných fluorescenční značkou s dienofily, jako jsou bicyklononyn (BCN) nebo TCO²⁶. Princip této fluorogenní reakce je založen na schopnosti tetrazinů zhaset fluorescenci některých fluoroforů (obr. 1c)²⁹. Jejich reakcí s BCN nebo TCO pak dochází ke vzniku pyridazinů nebo dihydropyridazinů, které už tuto zhasací schopnost nemají³⁰. Následkem je obnova fluorescence neboli rozsvícení připojeného fluoro-



Obr. 1. a) Fluorescenční značení bioortogonální reakcí; b) Fluorogenní verze reakce; c) Příklad fluorogenní reakce 1,2,4,5-tetrazinů



Obr. 2. Fluorogenní reakce tetrazin-kumarinů a příklad použití na živých buňkách

foru. Příkladem je reakce tetrazinů modifikovaných kumarinem, kterou lze použít k efektivnímu značení živých buněk (obr. 2).

Výše uvedený způsob fluorogenních reakcí využívá schopnost některých bioortogonálních činidel sloužit jako zhasič fluorescence. Jako jiný příklad fluorogenních reakcí lze uvést reakce, při kterých dochází ke vzniku fluoroforů *de novo*. Příkladem je reakce nitriliminů s nenasycenými dipolarofily³¹. Při této reakci dochází ke vzniku fluorescenčních pyrazolinů nebo pyrazolů³². V kombinaci s možností generování nitriliminů fotochemickým rozpadem tetrazolů tato reakce umožňuje sledovat, kde a kdy k modifikaci dojde³³.

Mezi jiné reakce tohoto typu patří reakce TCO nebo BCN s tetraziny nesoucími různé substituenty, zejména pak elektrondonorní skupiny³⁴. Při této reakci dochází ke vzniku dihydropyridazinů nebo aromatických pyridazinů, které jsou fluorescenční³⁵. Vhodnou substitucí tetrazinu pak lze modulovat fluorescenci vzniklých derivátů v široké škále barev³⁶. Tato reakce byla úspěšně použita např. při zobrazení biologicky aktivních látek, jako např. paklitaxel, v živých buňkách.

Mezi nejpokročilejší a také nejslibnější způsoby využití bioortogonálních reakcí v zobrazování patří využití v biomedicíně^{19,23}. Tento způsob použití se dnes běžně testuje na modelových zvířatech. Konkrétně se jedná o reakce umožňující použití např. v jednofotonové emisní výpočetní tomografii (z angl. Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) nebo v pozitronové emisní tomografii (z angl. Positron Emission Tomography, PET). Tento typ využití nachází uplatnění nejen v diagnostice, ale i medicíně.

4. Využití bioortogonálních reakcí pro aktivaci léčiv

Velkou část bioortogonálních reakcí lze charakterizovat jako reakce konjugační, tj. reakce, při kterých dochází ke spojení dvou komponent, mezi kterými vzniká nová chemická (zpravidla kovalentní) vazba. Druhou velkou skupinu bioortogonálních reakcí tvoří reakce štěpné, při kterých dochází k rozpojení vazeb³⁷. K rozpojení nicméně většinou dochází až po počátečním konjugačním kroku, který také slouží jako impuls pro následné rozpojení. Mezi tento druh bioortogonálních reakcí patří reakce iminosydonů s cykloalkyny³⁸ a reakce tetrazinů s alylovými deriváty *trans*-cyklooktenů³⁹. Vzhledem k mnohem širšímu využití druhé reakce se budeme v tomto oddíle věnovat tomuto typu a jejímu využití v aktivaci léčiv.

Při reakci tetrazinových derivátů s TCO dochází k Dielsově-Alderově reakci a eliminaci molekuly dusíku za vzniku dihydropyridazinů (Schéma 3). Jak bylo popsáno výše, tato reakce nachází široké uplatnění v biokonjugacích. Pokud však TCO obsahuje substituent v alylové poloze, dochází po počátečním konjugačním kroku k sérii elektronových přesunů a následné eliminaci připojeného substituentu. Tuto reakci lze popsat jako uvolnění *clickem* (z angl. *click-to-release*)³⁹.

Účinnost této reakce závisí na několika faktorech, zejména na způsobu připojení substituentu na TCO, na struktuře tetrazinu, a na pH prostředí⁴⁰. K uvolnění látek z alylové polohy TCO lze využít spojení přes karbamáty, karbonáty, estery anebo ethery⁴¹. V závislosti na použité látce pak ve výsledku dochází při reakci k uvolnění aminů nebo alkoholů. Struktura tetrazinu má na celý proces zásadní vliv. Tetraziny nesoucí elektronakceptorní substituenty reagují rychleji v prvním kroku (Dielsova-Alderova reakce), ale nevedou k účinné eliminaci. Na druhou stranu

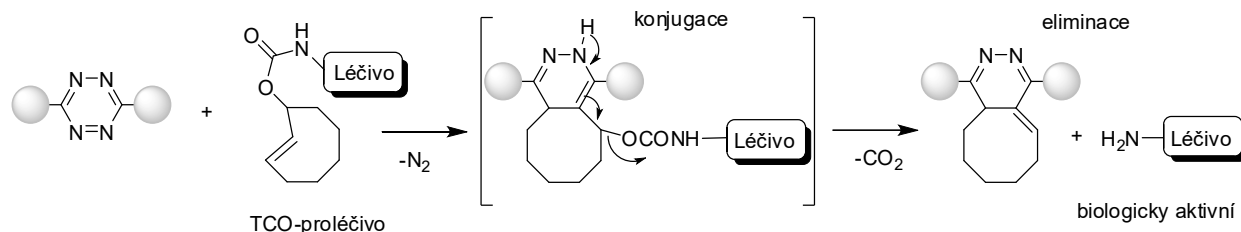


Schéma 4. Eliminací reakce 1,2,4,5-tetrazinů a alylických TCO umožňující aktivaci léčiv

nu, tetraziny nesoucí alky substituenty reagují pomaleji v prvním kroku, ale poskytují mnohem lepší výtěžky při eliminaci⁴². Proces eliminace lze urychlit provedením reakce za kyselých podmínek. Vhodným zavedením karboxylových skupin do struktury tetrazinu lze dosáhnout intramolekulárního přenosu kyselého vodíku, čímž dochází k dalšímu navýšení účinnosti eliminace⁴⁰.

Mezi hlavní využití reakce patří aktivace biologicky aktivních sloučenin z proléčiv⁴³. Jako proléčivo přitom slouží derivát aktivní látky, který obsahuje na vhodném místě TCO substituent (Schéma 4).

Vhodným místem je funkční skupina v rámci molekuly, která je důležitá pro biologickou aktivitu. Tímto způsobem lze blokovat biologickou aktivitu látky (analogue proléčiva), přičemž je následně možné biologickou aktivitu obnovit odštěpením TCO molekuly přidávkem tetrazinu⁴⁴.

Mezi první příklady využití aktivace TCO-proléčiv reakcí s tetraziny lze zařadit aktivaci protinádorové látky doxorubicinu³⁹. Blokadí volné aminogrupy této látky dochází k několikanásobnému snížení biologické aktivity. Následnou aktivací přidávkem tetrazinu se pak biologická aktivita doxorubicinu obnoví.

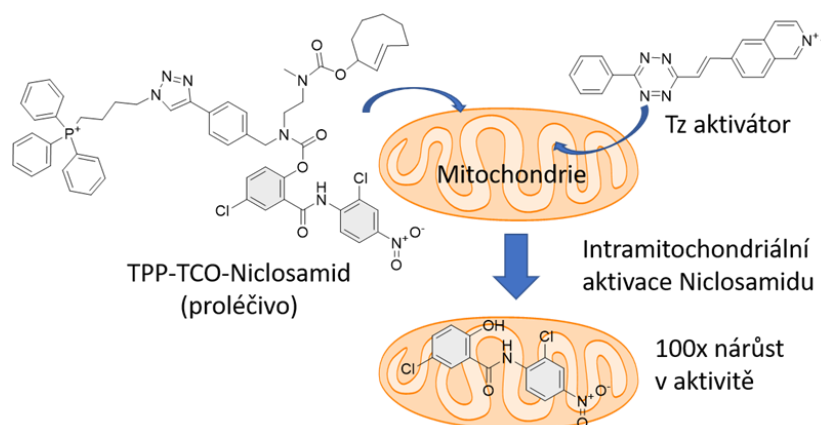
Tuto uvolňovací reakci lze také provádět v prostředí buněk, a dokonce v buněčných organelách. Jako příklad lze uvést specifickou aktivaci Niclosamidu v mitochondriích živých buněk, která vedla k významnému navýšení

účinnosti tohoto léčiva v porovnání s klasickým podáním (obr. 3)⁴⁵.

Další elegantní způsob využití uvolňování clickem byl demonstrován na uvolnění protinádorové látky auristatinu z konjugátu s protilátkou⁴⁶. Výhodou oproti běžným konjugátům tohoto typu je možnost kontrolovaného uvolňování léčiva (přidávkem tetrazinového aktivátoru) a možnost cílení na neinternalizující receptory. Tento způsob aktivace byl úspěšně demonstrován i na myším modelu. Princip uvolňování clickem v kombinaci s využitím biokompatibilních polymerů nesoucích proléčiva je také jedinou bioortogonální reakcí, která je v současnosti v prvních fázích klinických studií na lidech^{21,47}.

5. Vývoj nových bioortogonálních reakcí

Navzdory značnému pokroku v rozvoji a aplikacích zůstává vývoj nových bioortogonálních činidel a reakcí pořád aktuální a důležitý. Důvodem je zejména fakt, že žádná dnes známá bioortogonální reakce není univerzální. Jinými slovy to, který typ reakce je nejlepší použít v konkrétním případě, vždy záleží na zamýšlené aplikaci. Jak už bylo zmíněno v úvodu, bioortogonální reagenty musí být ideálně vysoce reaktivní a stabilní v biologickém prostředí, musí reagovat dostatečně rychle s druhým reakčním partnerem a nesmí být toxické vůči studovanému



Obr. 3 Intramitochondriální aktivace Niclosamidu z příslušného TCO-proléčiva vedoucí k nárůstu biologické aktivity

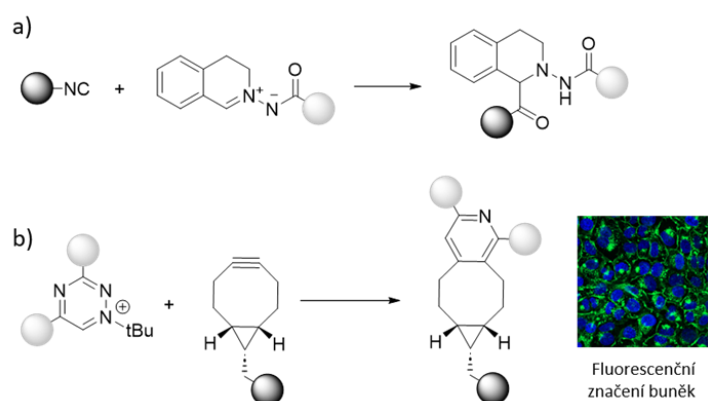


Schéma 5. a) Nová bioortogonální reakce azometin iminů s isonitrily; b) Bioortogonální ligace triaziniových solí a příklad použití při fluorescenčním značení povrchu buněk

organismu. Optimalizace všech těchto vlastností je nedílnou součástí procesu vývoje nových bioortogonálních reagentů a reakcí. Část těchto optimalizací lze provádět v chemické laboratoři, nicméně přenos takto získaných informací do prostředí živých organismů není vždy jednoduchý. Jedním z hlavních důvodů je, že simulovat podmínky v živých organismech je náročné. Přiblížení se realitě použitím pufrů, buněčných médií atd. je sice v oboru běžnou praxí, ale simulovat komplexnost podmínek např. v živých buňkách je náročné, ne-li zcela nemožné. Pokud je tedy cílem použít danou reakci např. pro značení proteinů v živých buňkách, jsou buňky ideálním prostředím pro optimalizaci dané reakce a reagentů. Nicméně optimalizovat chemickou reakci v tak složitém prostředí není triviální.

Mezi nejnovější přírůstky do rodiny bioortogonálních reakcí lze zařadit např. různé reakce katalyzované přechodnými kovy^{48–50} nebo reakce nanozymů, které imitují funkci přírodních enzymů nebo umožňují provádět nové, nepřírodní katalytické reakce⁵¹. Dalším příkladem nových bioortogonálních reagentů jsou azometin iminy (Schéma 5a)⁵². V kombinaci s isonitrily lze azometin iminy použít třeba pro značení proteinů nebo povrchu buněk fluorescenčními značkami. Reakce na přirozených funkčních skupinách proteinů a enzymů představují také důležitou oblast výzkumu. Z novějších metod stojí za zmínku třeba reakce pro modifikaci tyrosinů, která je indukována elektrochemicky⁵³. Mezi nejnovější činidla lze také zařadit N1-alkyl-triaziniové soli (Schéma 5b)⁵⁴. Tento typ reagentů umožňuje elegantní ladění reaktivity, stability a rozpustnosti různou obměnou struktury a substituentů. V reakci s napjatými cykloalkyny umožňuje tato tzv. triaziniová ligace značení biomolekul, jako jsou peptidy nebo proteiny. Navíc reakce dobře probíhá i v živých buňkách, kde umožňuje efektivní značení molekul fluorescenčními značkami za mírných podmínek.

6. Závěr

Bioortogonální reakce dnes nachází uplatnění v oblastech, kde bychom aplikaci chemických reakcí před 20 lety nečekali. Mezi nejslibnější aplikace lze zahrnout např. použití v různých zobrazovacích metodách a při vývoji nových biomedicínských postupů a molekul. Vývoj těchto unikátních nástrojů moderní chemie je náročný a zdoluhavý proces. Bioortogonální reakce dnes umožňují nejen spojení dvou komponent, jako jsou např. biomolekuly a malé syntetické látky, ale staly se i nástrojem pro aktivaci léčivých látek slibující účinnější, specifitější a bezpečnější léčbu různých závažných onemocnění. Vzhledem k dosaženým výsledkům lze očekávat, že rozvoj této vědní disciplíny bude pokračovat i v budoucnu a že kombinace vědních disciplín za hranicemi chemie a biologie nám otevře nové možnosti pro studium biologických systémů a pro vývoj lepších diagnostických a biomedicínských nástrojů.

Tato práce byla podpořena institucionálním financováním ÚOCHB AV ČR (RVO: 61388963) a projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU. Poděkování patří všem bývalým i současným studentům a spolupracovníkům uvedeným jako spoluautoři citovaných publikací.

LITERATURA

- Sletten E. M., Bertozzi C. R.: *Acc. Chem. Res.* **44**, 666 (2011).
- Saxon E., Bertozzi C. R.: *Science* **287**, 2007 (2000).
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 2004 (2001).
- Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **41**, 2596 (2002).

5. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M.: *J. Org. Chem.* **67**, 3057 (2002).
6. Meldal M., Tornøe C. W.: *Chem. Rev.* **108**, 2952 (2008).
7. Haldón E., Nicasio M. C., Pérez P. J.: *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9528 (2015).
8. Meldal M., Diness F.: *Trends Chem.* **2**, 569 (2020).
9. Kennedy D. C., McKay C. S., Legault M. C. B., Danielson D. C., Blake J. A., Pegoraro A. F., Stolorow A., Mester Z., Pezacki J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17993 (2011).
10. Presolski S. I., Hong V., Cho S. H., Finn M. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14570 (2010).
11. Besanceney-Webler C., Jiang H., Zheng T. Q., Feng L., del Amo D. S., Wang W., Klivansky L. M., Marlow F. L., Liu Y., Wu P.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 8051 (2011).
12. Agard N. J., Prescher J. A., Bertozzi C. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046 (2004).
13. Debets M. F., van Berkel S. S., Dommerholt J., Dirks A. J., Rutjes F. P. J. T., van Delft F. L.: *Acc. Chem. Res.* **44**, 805 (2011).
14. Dommerholt J., Rutjes F. P. J. T., van Delft F. L.: *Top. Curr. Chem.* **374**, (2016).
15. Knall A. C., Slugovc C.: *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5131 (2013).
16. Oliveira B. L., Guo Z., Bernardes G. J. L.: *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895 (2017).
17. Darko A., Wallace S., Dmitrenko O., Machovina M. M., Mehl R. A., Chin J. W., Fox J. M.: *Chem. Sci.* **5**, 3770 (2014).
18. Fang Y., Zhang H., Huang Z., Scinto S. L., Yang J. C., am Ende Christopher W., Dmitrenko O., Johnson D. S., Fox J. M.: *Chem. Sci.* **9**, 1953 (2018).
19. Zhao G. X., Li Z. T., Zhang R. S., Zhou L. M., Zhao H. B., Jiang H. F.: *Front. Mol. Biosci.* **9**, (2022).
20. Mitry M. M. A., Greco F., Osborn H. M. I.: *Chem. Eur. J.* **29**, (2023).
21. Peplow M.: *Nat. Biotechnol.* **41**, 883 (2023).
22. Gonçalves M. S. T.: *Chem. Rev.* **109**, 190 (2009).
23. Yang J., Zhu B., Ran C.: *Chem. Biomed. Eng.* **1**, 434 (2023).
24. Liu J., Cui Z. Q.: *Bioconjugate Chem.* **31**, 1587 (2020).
25. Zhang G., Zheng S. Q., Liu H. P., Chen P. R.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3405 (2015).
26. Kozma E., Demeter O., Kele P.: *ChemBioChem* **18**, 486 (2017).
27. Liu C. C., Schultz P. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 413 (2010).
28. Nadler A., Schultz C.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **52**, 2408 (2013).
29. Choi S. K., Kim J., Kim E.: *Molecules* **26**, 1868 (2021).
30. Pinto-Pacheco B., Carbery W. P., Khan S., Turner D. B., Buccella D.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **59**, 22140 (2020).
31. Kaya E., Vrabel M., Deiml C., Prill S., Fluxa V. S., Carell T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 4466 (2012).
32. Kumar G. S., Racioppi S., Zurek E., Lin Q.: *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 57 (2022).
33. Kumar G. S., Lin Q.: *Chem. Rev.* **121**, 6991 (2021).
34. Siegl S. J., Galeta J., Dzajak R., Vázquez A., Del Río-Villanueva M., Dracinsky M., Vrabel M.: *ChemBioChem* **20**, 886 (2019).
35. Siegl S. J., Vazquez A., Dzajak R., Dracinsky M., Galeta J., Rampmaier R., Klepetarova B., Vrabel M.: *Chem. Eur. J.* **24**, 2426 (2018).
36. Vazquez A., Dzajak R., Dracinsky M., Rampmaier R., Siegl S. J., Vrabel M.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **56**, 1334 (2017).
37. Li J., Chen P. R.: *Nat. Chem. Biol.* **12**, 129 (2016).
38. Ribéraud M. a 12 spoluautorů: *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 2219 (2023).
39. Versteegen R. M., Rossin R., ten Hoeve W., Janssen H. M., Robillard M. S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **52**, 14112 (2013).
40. Carlson J. C. T., Mikula H., Weissleder R.: *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 3603 (2018).
41. Versteegen R. M., ten Hoeve W., Rossin R., de Geus M. A. R., Janssen H. M., Robillard M. S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **57**, 10494 (2018).
42. Fan X. Y. a 11 spoluautorů: *Angew. Chem., Int. Ed.* **55**, 14046 (2016).
43. Ji X. Y., Pan Z. X., Yu B. C., De la Cruz L. K., Zheng Y. Q., Ke B. W., Wang B. H.: *Chem. Soc. Rev.* **48**, 1077 (2019).
44. Neumann K., Gambardella A., Bradley M.: *ChemBioChem* **20**, 872 (2019).
45. Dzajak R., Galeta J., Vázquez A., Kozák J., Matoušová M., Fulka H., Dračínský M., Vrabel M.: *JACS Au* **1**, 23 (2021).
46. Rossin R. a 10 spoluautorů: *Nat. Commun.* **9**, 1484 (2018).
47. McFarland J. M., Aleckovic M., Coricor G., Srinivasan S., Tso M., Lee J. H., Nguyen T. H., Oneto J. M. M.: *ACS Cent. Sci.* **9**, 1400 (2023).
48. Liu X., Huang T. J., Chen Z. W., Yang H. H.: *Chem. Commun.* **59**, 12548 (2023).
49. James C. C., de Bruin B., Reek J. N. H.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **62**, e202306645 (2023).
50. Tomás-Gamasa M., Martínez-Calvo M., Couceiro J. R., Mascareñas J. L.: *Nat. Commun.* **7**, 12538 (2016).
51. Keum C., Hirschbiegel C. M., Chakraborty S., Jin S., Jeong Y., Rotello V. M.: *Nano Convergence* **10**, 42 (2023).
52. Markos A., Biedermann M., Heimgärtner J., Schmitt A., Lang K., Wennemers H.: *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 19513 (2023).
53. Alvarez-Dorta D., Thobie-Gautier C., Croyal M., Bouzelha M., Mevel M., Deniaud D., Boujtita M., Gouin S. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17120 (2018).
54. Šlachtová V. a 10 spoluautorů: *Angew. Chem., Int. Ed.* **62**, e202306828 (2023).

M. Vrábek and V. Šlachtová (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Development and Application of Bioorthogonal Reactions for Drug Imaging and Activation**

Chemical transformations compatible with biological systems serve as invaluable tools for probing biomolecules, drug compounds, and biological processes in their native environments. The complex environment of living organisms requires these reactions to be highly selective and efficient, posing a formidable challenge to the field of organic chemistry. A number of chemical reactions have recently emerged to meet this challenge, providing a diverse toolkit for researchers. This manuscript presents a comprehensive survey of current bioorthogonal reactions, emphasizing their applications in bioimaging, diagnostics, and medicine.

Keywords: click chemistry, bioorthogonal reactions, imaging, fluorescent labeling, prodrugs

Acknowledgements

This work was supported by the institutional funding of the IOCB of the Czech Academy of Sciences (RVO: 61388963) and by the National Institute for Research on Metabolic and Cardiovascular Diseases (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU. We would like to thank to all former and current students and collaborators listed as co-authors of the cited publications.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.