

Bioorthogonal chemistry: when living organisms become reaction flasks

QUÍMICA BIOORTOGONAL: CUANDO LOS ORGANISMOS VIVOS SE CONVIERTEN EN MATRACES DE REACCIÓN

Javier Idiago-López,^{ab} Jesús M. De la Fuente,^{ab} Raluca M. Fratila^{*ab,c}

En este artículo se introducen los conceptos de química "click" y química bioortogonal, que han recibido el Premio Nobel de Química 2022 por sus numerosas ventajas (sencillez, robustez, rendimientos prácticamente cuantitativos, etc.). Se describen en detalle las principales reacciones bioortogonales, las cuales se pueden llevar a cabo en sistemas vivos, como células e incluso animales, que se convierten en exóticos "matraces de reacción". También se proporciona una visión general de los últimos avances en bionanomedicina, surgidos gracias a la combinación de la química bioortogonal con las propiedades únicas de los nanomateriales. Para ello, se presentan las principales características de los nanomateriales y describen algunos estudios recientes relacionados con el desarrollo de nuevas herramientas de imagen y terapia.

Palabras clave: química click, química bioortogonal, glicoingeniería metabólica, nanomedicina, diagnóstico, terapia

In this article, we introduce the concepts of click chemistry and bioorthogonal chemistry, which have received the Nobel Prize in Chemistry 2022 for their numerous advantages (simplicity, robustness, practically quantitative yields, etc.). We describe the main bioorthogonal reactions that can be carried out in living systems, such as cells and even animals, which become exotic "reaction flasks". We also provide an overview of the latest advances in bionanomedicine, which were made possible by the combination of bioorthogonal chemistry with the unique properties of nanomaterials. To this end, the main characteristics of nanomaterials are presented, and some recent studies related to the development of new imaging and therapeutic tools are described.

Keywords: click chemistry, bioorthogonal chemistry, metabolic glycoengineering, nanomedicine, diagnostic, therapy

Recibido: 25 de febrero de 2023

Aceptado en forma final: 12 de abril de 2023

Cómo citar este artículo: Idiago-López, Javier, De la Fuente, J. M., Fratila, R. M. "Química bioortogonal: cuando los organismos vivos se convierten en matraces de reacción", Revista de Química, 2023, 37(1), 2-12.

DOI: <https://doi.org/10.18800/quimica.202301.001>

^a Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, INMA (CSIC-Universidad de Zaragoza), 50009, Zaragoza, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Instituto de Salud Carlos III, 50018 Zaragoza, Spain

^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

 Javier Idiago-López: <https://orcid.org/0000-0002-3373-9341>

 Jesús M. De la Fuente: <https://orcid.org/0000-0003-1081-8482>

 Raluca M. Fratila: <https://orcid.org/0000-0001-5559-8757>

*autor de correspondencia: rfratila@unizar.es



INTRODUCCIÓN

El término "química click", acuñado en 2001 por K. Barry Sharpless, incluye una serie de reacciones químicas que poseen características únicas en términos de selectividad, cinética rápida, simplicidad, rendimientos elevados, ausencia de productos secundarios, robustez y eficiencia. Pensemos en un gesto que muchos habremos hecho muchas veces en nuestra vida: abrocharnos un cinturón de seguridad en un avión. Ese "click" que suena cuando nos abrochamos el cinturón nos indica que hemos juntado con éxito las dos partes del cinturón y es una analogía muy sencilla del concepto que aquí nos ocupa, de una reacción que cumple los criterios mencionados anteriormente. Cuando además de todas estas características se va un paso más allá y se añade como requisito la compatibilidad de estas reacciones con las condiciones biológicas propias de células y organismos vivos, surge el término de "química bioortogonal", o química compatible con los seres vivos.

A pesar de ser conceptos relativamente nuevos (los primeros trabajos de química "click" y de química bioortogonal se publicaron a partir del año 2000), su simplicidad y eficacia, así como su enorme potencial en el campo de la química, la biología, la bioquímica, la ciencia de los materiales y la nanotecnología han hecho que la química "click" y la química bioortogonal sean merecedoras del Premio Nobel de Química 2022, otorgado a K. Barry Sharpless, Morten Meldal y Carolyn Bertozzi. En palabras del presidente del Comité Nobel de Química, Johan Åqvist, *"El Premio de Química de este año trata sobre no complicar demasiado las cosas, sino de trabajar con lo que es fácil y sencillo. Las moléculas funcionales pueden construirse incluso siguiendo un camino sencillo"*.¹

Algunos ejemplos típicos de reacciones "click" incluyen las cicloadiciones 1,3-dipolares y las cicloadiciones Diels-Alder, las reacciones de adición a enlaces múltiple carbono-carbono (epoxidación, dihidroxilación, adiciones de Michael) o las aperturas de anillo de heterociclos tensionados electrófilos (por ejemplo, epóxidos y aziridinas).²

QUÍMICA BIOORTOGONAL O CÓMO VER LAS BIOMOLÉCULAS EN SU ENTORNO HABITUAL

La química bioortogonal tiene sus inicios en el grupo liderado por Carolyn Bertozzi, ante el creciente interés por analizar y comprender los complejos procesos biológicos y celulares en el contexto de las células vivas y los organismos completos.³ Esta tarea requiere del desarrollo de estrategias

que permitan investigar y realizar un seguimiento de las biomoléculas dentro de su entorno nativo, usando marcadores específicos (por ejemplo, sondas fluorescentes). En este contexto, los métodos convencionales se basan en el uso de etiquetas codificadas genéticamente, como la proteína verde fluorescente ("Green Fluorescent Protein", GFP), o de anticuerpos específicos. No obstante, los anticuerpos y las proteínas, si bien han permitido avanzar en el conocimiento acerca de los papeles que juegan ciertas proteínas en procesos celulares dinámicos, son biomoléculas de tamaño grande, cuyo uso puede perturbar la estructura y/o la función de la proteína objeto de estudio. Pero, aún más importante, los anticuerpos y las proteínas no pueden utilizarse fácilmente para estudiar otros tipos de biomoléculas, como los lípidos, los ácidos nucleicos o los carbohidratos. El grupo de Carolyn Bertozzi, en concreto, llevaba años estudiando los carbohidratos complejos presentes en las membranas de nuestras células. Se trata de biomoléculas que juegan un papel muy importante en muchas enfermedades infecciosas y en muchos tipos de cáncer,⁴ y también determinan el tipo de sangre de cada persona. Sin embargo, estudiar estos carbohidratos en su entorno biológico no era una tarea fácil, debido a su heterogeneidad, a su incompatibilidad con las etiquetas codificadas genéticamente y a que no se les podían aplicar las herramientas clásicas de biología molecular (por ejemplo, los anticuerpos que reconocen estos carbohidratos suelen tener bajas afinidades).

Ante este reto, los investigadores empezaron a preguntarse si era posible modificar químicamente las biomoléculas de interés. Se trataría de incorporar un grupo químico a modo de sonda o reportero* en la biomolécula diana, utilizando los propios mecanismos biosintéticos y metabólicos de la célula. De este modo, en una segunda etapa, las moléculas exógenas que actuarían como marcadores formarían enlaces covalentes selectivos con la biomolécula diana modificada (**Figura 1**). La idea de hacer química bioortogonal era desde luego rompedora, pero suponía un reto formidable, teniendo en cuenta todos los obstáculos encontrados a nivel celular. En primer lugar, era necesaria una reacción rápida, que tuviera lugar en medio acuoso a 37 °C y pH fisiológico. Además, los reactivos usados debían ser inocuos para la célula y los grupos funcionales implicados en la reacción no podían participar en reacciones secundarias con otros grupos funcionales endógenos.

Las azidas y sus reacciones como sondas bioortogonales ideales

Quedaba claro, pues, que no todos los grupos químicos pueden funcionar como sondas bioortogonales, es decir, que presenten la capacidad de no interferir (o interferir

* En la bibliografía relacionada con la química bioortogonal, los términos "sonda" ("probe"), "etiqueta" ("tag") y "reportero" ("reporter") se usan de manera equivalente.

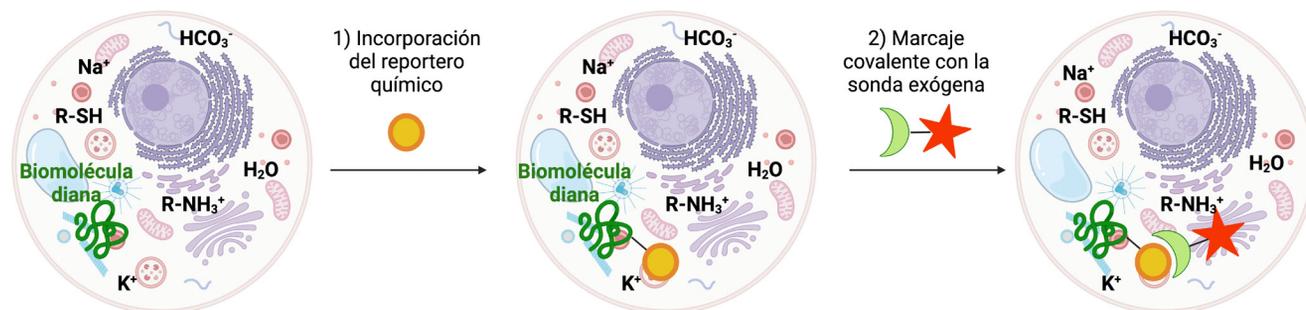


Figura 1. Estrategia de etiquetado bioortogonal. En el primer paso, el reportero químico (círculo naranja) se introduce selectivamente en la biomolécula diana (en verde en la célula). En el segundo paso, la sonda exógena (estrella roja) se une de manera covalente al reportero químico mediante una reacción bioortogonal. Figura creada con Biorender.com.

mínimamente) con las funcionalidades biológicas y que al mismo tiempo tengan una reactividad selectiva hacia su pareja bioortogonal en sistemas vivos.

Los principales grupos químicos que cumplen con los requisitos de bioortogonalidad son las cetonas, los aldehídos, las azidas, los alquinos y los alquenos.⁵ De entre todas estas grupos, las azidas han ganado una inmensa popularidad, gracias a sus numerosas ventajas. En primer lugar, son grupos verdaderamente abióticos (ausentes prácticamente en todo sistema biológico). Únicamente se ha descrito la presencia de un metabolito natural con el grupo azida en una familia de algas, la *Gymnodinium breve*.⁶

Su uso otorga, por tanto, una elevada selectividad, evitando posibles reacciones secundarias con los nucleófilos abundantes en los sistemas vivos. En segundo lugar, al tratarse de un grupo triatómico de muy pequeño tamaño, su incorporación en cualquier tipo de biomolécula no tiene un impacto relevante sobre su estructura, propiedades y/o funcionalidad. Además, las azidas presentan una elevada estabilidad metabólica en condiciones fisiológicas y únicamente son capaces de descomponerse a temperaturas superiores a los 120 °C. Por último, las azidas pueden actuar como dipolos 1,3 o como electrófilos blandos, dos comportamientos químicos muy poco frecuentes en la naturaleza.

La principal forma de introducir grupos azida en biomoléculas es a través de un proceso conocido como *glicoingeniería metabólica*. Se usan análogos de monosacáridos modificados (llamados precursores metabólicos) que son captados por las células, reconocidos y tolerados por la maquinaria enzimática biosintética e incorporados a glicanos y glicoconjugados (proteínas o lípidos).⁷ Esta estrategia cuenta con dos ventajas fundamentales. En primer lugar, ajustando la concentración del precursor metabólico, se obtiene un alto grado de control sobre la expresión de grupos azida en membrana (se dice que la expresión es *dosis-dependiente*).⁸ En segundo lugar, es un

método universal, aplicable prácticamente a cualquier línea celular, así como *in vivo*.⁹

El precursor metabólico más utilizado es la N-azidoacetil manosamina tetraacetilada (Ac_4ManNAz), la cual es desacetilada por las esterasas intracelulares para entrar en la cascada enzimática intracelular que deriva en la expresión de los glicanos en la membrana celular.¹⁰ La forma tetraacetilada es preferida a la forma libre, ya que de este modo se reduce la polaridad de los grupos hidroxilo propios de la N-acetil manosamina y se favorece la permeabilidad celular del compuesto.

Las tres modalidades de reacción bioortogonal en las que participan las azidas son la ligación de Staudinger, la cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) y la cicloadición azida-alquino promovida por tensión de anillo (SPAAC).⁵ La ligación de Staudinger, basada en la reacción entre azidas y triarilfosfinas, representa de hecho el primer ejemplo de reacción "click" bioortogonal en organismos vivos, descrito por el grupo de C. Bertozzi en el año 2000.¹¹ Se trata de una modificación de la reacción de Staudinger clásica¹² por medio de la incorporación de un grupo éster en uno de los sustituyentes arílicos para, de este modo, conferir estabilidad al intermedio formado durante la reacción y evitar su hidrólisis para dar lugar a una amina primaria (**Figura 2**). En este primer ejemplo, Bertozzi y su equipo demostraron que la incubación de células Jurkat (una línea celular inmortalizada de linfocitos T) con Ac_4ManNAz para la modificación metabólica de las glicoproteínas de membrana con grupos azida y la posterior reacción de los grupos azida con triarilfosfina daba lugar a un marcaje específico de las membranas celulares. No obstante, esta reacción resultó ser demasiado lenta ($k = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para ser eficiente *in vivo*; además, se descubrió que las fosfinas sufrían con facilidad un proceso de oxidación en medios biológicos.^{13,14}

Más o menos al mismo tiempo, los grupos de K. Barry Sharpless y Morten Meldal publicaron de manera

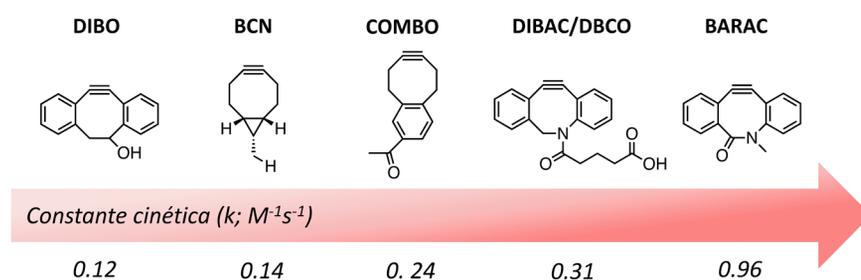
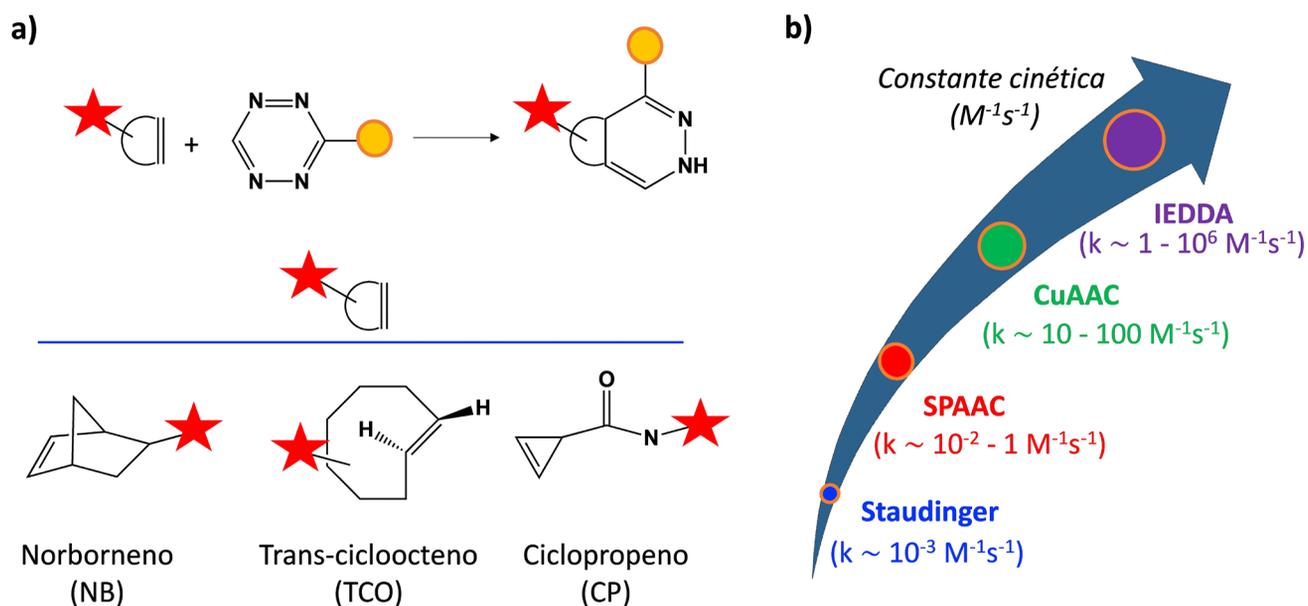


Figura 4 (izquierda). Cinética de reacción para distintos tipos de alquenos tensionados. DIBO: dibenzociclooctino; BCN: biciclononino; COMBO: carboximetilmonobenzociclooctino; DIBAC: dibenzoazaciclooctino (también conocido como DBCO: dibenzociclooctino); BARAC: biarilazaciclooctino. Adaptado con permiso de John Wiley & Sons Ltd de la referencia 21, Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell. *Angewandte Chemie International Edition* 2021, 60, 23084–23105, Copyright (2021).

Figura 5 (abajo). a) Esquema de la reacción Diels-Alder de demanda inversa de electrones. b) Comparativa de la cinética de reacción de los distintos tipos de reacciones click.



baja reactividad de los primeros ciclooctinos reportados por el grupo de Bertozzi, cuyas cinéticas de reacción no mejoraban con respecto a la reacción de Staudinger. De esta manera, se pudieron alcanzar cinéticas hasta 400 veces más rápidas con derivados de biarilazaciclooctino, BARAC ($k = 0.96 M^{-1} s^{-1}$, **Figura 4**).^{21,22}

Otras reacciones bioortogonales

En el año 2008, los grupos de J. M. Fox y S. A. Hilderbrand describieron de manera casi simultánea la reacción Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA, del inglés “*Inverse electron demand Diels–Alder reaction*”).^{23,24} Esta reacción se produce entre un dieno con déficit electrónico, como la 1,2,4,5-tetrazina (Tz), y un alqueno dienófilo, como el trans-cicloocteno (TCO), el norborneno (NB), el ciclopropeno (CP) o determinados ciclooctinos como el biciclononino (BCN) o el dibenzociclooctino (DBCO) (**Figura**

5a). Cabe resaltar que la IEDDA representa la reacción “click” bioortogonal más rápida descrita hasta la fecha, con cinéticas de hasta $10^6 M^{-1} s^{-1}$ (**Figura 5b**).²⁵ Esta cinética garantiza que la reacción pueda tener lugar eficazmente en escalas de tiempo biológicas y a bajas concentraciones, similares a las de muchas biomoléculas relevantes en los sistemas vivos.

Por último, se han descrito otras formas alternativas de química click bioortogonal, aunque su uso está menos extendido que el de las anteriormente comentadas. Este es, por ejemplo, el caso de las denominadas reacciones “fotoclick”, basadas en el uso de una fuente de energía en forma de haces de fotones que inducen un estado energético superior en los reactivos implicados, a partir del cual se puede proceder efectivamente a vías de reacción química alternativas.²⁶ Ejemplos característicos de este tipo de reacciones son la cicloadición 1,3-dipolar inducida por la luz ultravioleta (UV) entre tetrazoles y alquenos (reacción tetrazol-eno) y la adición radicalaria de tioles a alquenos (reacción tiol-eno).²⁶

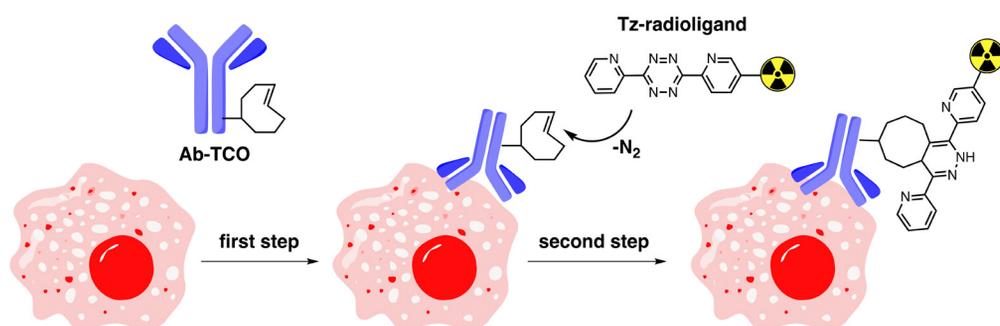


Figura 6. Estrategia de pre-orientación basada en la reacción Diels-Alder de demanda inversa de electrones. TCO: trans-cicloocteno; Tz: tetrazina. Adaptado con permiso de John Wiley & Sons Ltd de la referencia 28, Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. *In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. Angew Chem Int Ed* 2010, 122, 3447–3450.

Reacciones bioortogonales *in vivo*: gusanos, peces cebra, ratones y otros “matraces de reacción”

El primer ejemplo de aplicación de la química bioortogonal *in vivo* data de 2004, cuando el grupo de Carolyn Bertozzi demostró que la reacción de Staudinger se podía llevar a cabo no solo en células, sino también en medios extremadamente complejos como organismos vivos (en este caso, ratones).²⁷ No obstante, como se ha comentado en el apartado anterior, la reacción de Staudinger no tiene una cinética favorable para la visualización *in vivo* de procesos biológicos dinámicos. El desarrollo de la reacción SPAAC ha supuesto avances importantes en este sentido, permitiendo la imagen no invasiva de glicanos en peces cebra vivos⁹ o en *Caenorhabditis elegans*.²⁸ Por otro lado, la química bioortogonal basada en la reacción IEDDA ha abierto un nuevo camino para la radioinmunoterapia de tumores sólidos mediante las estrategias de pre-orientación de anticuerpos a los tumores, seguida de la unión del radioligando (**Figura 6**).²⁹ Desde su publicación en 2010, esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para fines diagnósticos y terapéuticos en cáncer.^{30,31}

El concepto de química bioortogonal también ha permitido a los científicos explorar la formación *in situ* de moléculas con actividad biológica en su sitio de acción deseado,³² o la activación selectiva de profármacos (compuestos precursores de fármacos, pero inactivos) en la zona a tratar, típicamente un tumor.^{33,34} Estos experimentos se han llevado a cabo con éxito sobre todo en ratones, aunque recientemente la empresa biotecnológica estadounidense Shasqi ha comenzado un ensayo clínico que representa la primera aplicación de la química bioortogonal en humanos, usando su plataforma CAPAC™ (“Click Activated Prodrugs Against Cancer”).^{35,36} El ensayo clínico se encuentra en fase 2, en la que se evalúan la seguridad y tolerabilidad, así como la capacidad del tratamiento para reducir el tamaño de los tumores en pacientes con sarcoma de tejidos blandos y cáncer de cabeza y cuello.

QUÍMICA BIOORTOGONAL Y NANOMEDICINA: NUEVAS APLICACIONES EN DIAGNÓSTICO Y TERAPIA

El gran potencial que ofrece la química bioortogonal es por sí solo inmenso. Pero en las últimas dos décadas su combinación con la nanotecnología ha hecho que el número de publicaciones relacionadas con las aplicaciones biomédicas de este enfoque único haya crecido de forma exponencial.⁵ En particular, esta combinación permite abordar soluciones nuevas o mejoradas para problemas acuciantes relacionados con el diagnóstico y la terapia, como son la sensibilidad (en el caso de la obtención de imágenes y la detección), la acumulación tumoral de las nanopartículas (NP), la optimización de la eficacia terapéutica, etc.

El origen de la nanotecnología se remonta a 1959, cuando Richard Feynman postuló los primeros conceptos en nanociencia y nanotecnología en la famosa conferencia “There’s Plenty of Room at the Bottom”.³⁷ Feynman, sin llegar a pronunciar el término “nano”, estableció las implicaciones que derivan de manipular y controlar las cosas a una escala muy pequeña. Sin embargo, no fue hasta 1974 cuando nació el término “nanotecnología” y se establece su definición como “la manipulación de la materia con al menos una dimensión de 1 a 100 nanómetros” por parte de la NNI (Iniciativa Nacional en Nanotecnología de Estados Unidos), considerando el nanómetro (nm) como una unidad de medida del sistema internacional que representa 10^{-9} metros. El verdadero interés de la nanotecnología radica en que, en estas dimensiones, las propiedades de los materiales varían significativamente en comparación con las que presentan en su estado macroscópico. Estas nuevas propiedades emergen como consecuencia de dos fenómenos principales. El primero de ellos es el aumento de la relación superficie-volumen que conlleva un aumento del número de átomos en la superficie respecto a los presentes en el núcleo del nanomaterial, favoreciendo así la reactividad y/o capacidad catalítica de los mismos. El segundo es el efecto cuántico que consiste

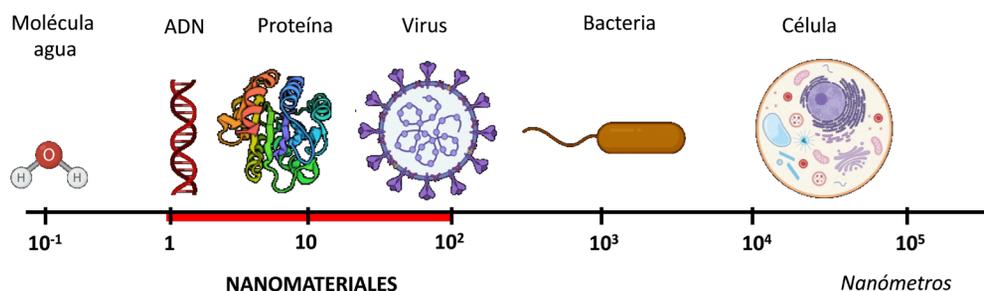


Figura 7. Escala de tamaño en nanómetros con la comparación del tamaño de los nanomateriales con algunas biomoléculas y entidades biológicas. Figura de elaboración propia creada con BioRender.

en una modificación de la estructura electrónica, pasando los electrones a ocupar diferentes niveles de energía.³⁸ Todo ello lleva a que los nanomateriales sean capaces de albergar propiedades específicas muy interesantes, incluyendo propiedades químicas, eléctricas, mecánicas y ópticas, y que al mismo tiempo éstas puedan ser predefinidas en base a la modificación de la forma o el tamaño de los mismos.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la mayoría de las biomoléculas y estructuras biológicas relevantes se encuentran en la escala nanométrica (**Figura 7**), la interacción de los nanomateriales con las entidades biológicas puede aumentar drásticamente en términos de selectividad y eficiencia.³⁹ Esto ha hecho que la conexión entre los nanomateriales y la medicina o la biotecnología esté dando lugar a algunas de las aplicaciones más prometedoras de la nanotecnología en el siglo XXI, hasta el punto de que han surgido nuevos campos de conocimiento como la nanomedicina y bionanotecnología. En este contexto, se están estudiando aplicaciones como el diagnóstico mediante técnicas analíticas o de imagen, la administración controlada de fármacos, la regeneración de tejidos o el seguimiento celular *in vivo*, entre otras. Cabe destacar que a día de hoy existe una gran variedad de nanomateriales, siendo las nanopartículas de oro, las nanopartículas poliméricas, los liposomas y las nanopartículas magnéticas las más utilizadas en nanobiomedicina.

Nuevas herramientas de diagnóstico basadas en química bioortogonal y nanomateriales

Determinados tipos de NPs presentan ventajas importantes frente a los métodos convencionales empleados para la monitorización de procesos biológicos a nivel celular y molecular, basados en el uso de sondas fluorescentes orgánicas o de proteínas fluorescentes.⁴⁰ Así por ejemplo, se ha descrito el uso de distintos tipos de NP en combinación con la química “click” bioortogonal (por ejemplo, quantum dots,⁴¹ nanodiamantes,⁴² NP de oro,⁴³ etc.) para aplicaciones en bioimagen, demostrando mejoras en términos de sensibilidad, especificidad y estabilidad temporal.

El uso de la nanotecnología también hace posible el desarrollo de sondas de imagen multimodal, en las que se combinan varios tipos de nanopartículas. Un ejemplo sería la plataforma desarrollada por Lee *et al.*,⁴⁴ quienes prepararon nanopartículas poliméricas de glicol quitosano funcionalizadas con un alquino tensionado (BCN) y encapsularon distintos tipos de agentes de imagen (cianina Cy5.5 para fluorescencia, nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro para resonancia magnética de imagen – RMI y nanopartículas de oro para imagen por tomografía computarizada). Los autores demostraron la unión de estas nanopartículas multimodales mediante SPAAC a células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo pretratadas con $Ac_4ManNAz$ para la expresión de grupos azida en la membrana. Esta estrategia permitió llevar a cabo el seguimiento de las células madre mediante las distintas técnicas de imagen durante al menos 15 días tras su inyección subcutánea en modelos de ratón desnudos, mientras que sin el uso de la química bioortogonal, la ventana temporal para el seguimiento se reducía a 5 días.

En el campo del diagnóstico, la detección de biomoléculas sigue siendo un reto, especialmente cuando se trata de bajas concentraciones de analitos o muestras complejas. En este contexto, la estrategia de pre-orientación mencionada anteriormente se puede aplicar con éxito para el desarrollo de técnicas de imagen más sensibles. Un ejemplo relevante de este campo es la estrategia desarrollada por el grupo de Weissleder basada en la reacción entre NPM fluorescentes y anticuerpos mediante la reacción IEDDA.⁴⁵ Esta estrategia presenta dos variantes, la primera de ellas consiste en la conjugación del anticuerpo y la NPM antes de la incubación con las células, mientras que en la segunda, las células se incuban inicialmente con el anticuerpo modificado con *trans*-cicloocteno, que actúa como un andamiaje para múltiples uniones covalentes de las NPM modificadas con tetrazina, permitiendo así la amplificación de la señal de detección. Con esta estrategia se han llevado a cabo estudios relacionados con el reconocimiento de biomarcadores específicos en células tumorales⁴⁶ o incluso la detección de bacterias patógenas.⁴⁷

El uso de la química click bioortogonal en combinación con las nanopartículas ha supuesto también un enorme avance de cara a su aplicación terapéutica frente al cáncer a través de la unión específica de las NP a células tumorales. En este sentido, las estrategias convencionales basadas en la funcionalización de las NP con determinados ligandos específicos (anticuerpos, péptidos, carbohidratos, etc.) que reconocen receptores presentes en la superficie de las células tumorales, sufren de limitaciones relacionadas con la heterogeneidad entre células o la disponibilidad limitada de estos receptores. Por su parte, la química click en combinación con métodos capaces de introducir receptores artificiales en la membrana de células tumorales, de forma controlada y con independencia del tipo de célula (por ejemplo, a través de glicoingeniería metabólica, como se ha descrito anteriormente), permite superar estas limitaciones y abordar en mejores condiciones la vectorización de las NP hacia las células diana.^{5,48} El concepto de etiquetado universal de células tumorales mediante glicoingeniería metabólica se describe en la **Figura 8**.

El primer ejemplo del uso de la química "click" bioortogonal para la vectorización específica de células tumorales con nanopartículas fue descrito por el grupo de K. Kim en el año 2012.⁴⁹ Utilizando la $Ac_4ManNAz$ como precursor

metabólico de azidas en la membrana celular, evaluaron la unión de liposomas funcionalizados con DBCO a través de la reacción SPAAC, y observaron una unión preferencial respecto al control de liposomas sin DBCO. Además, este efecto se constató en varios tipos de células tumorales - carcinoma de pulmón humano (A549), glioblastoma humano (U87MG), carcinoma nasofaríngeo humano (KB) y adenocarcinoma de mama humano (MCF7). Adicionalmente, confirmaron la potencial aplicación in vivo en ratones con tumores generados por implantación de células A549. Para ello, inyectaron de manera intratumoral la $Ac_4ManNAz$ y, posteriormente, administraron de forma intravenosa los liposomas funcionalizados. De este modo, se observó una acumulación preferencial de los liposomas en el tumor respecto a los controles inyectados con tampón salino en lugar de $Ac_4ManNAz$. Además, se estableció que el efecto era dependiente de la concentración de $Ac_4ManNAz$ inyectada. Desde entonces, esta estrategia y/o el uso de anticuerpos funcionalizados con distintos grupos bioortogonales como receptores de la unión "click" de NP se han empleado en numerosas ocasiones y con distintos tipos de NP, no solo para la vectorización específica, sino también en combinación con aplicaciones de terapia fotodinámica⁵⁰ o liberación controlada de fármacos.^{51,52}

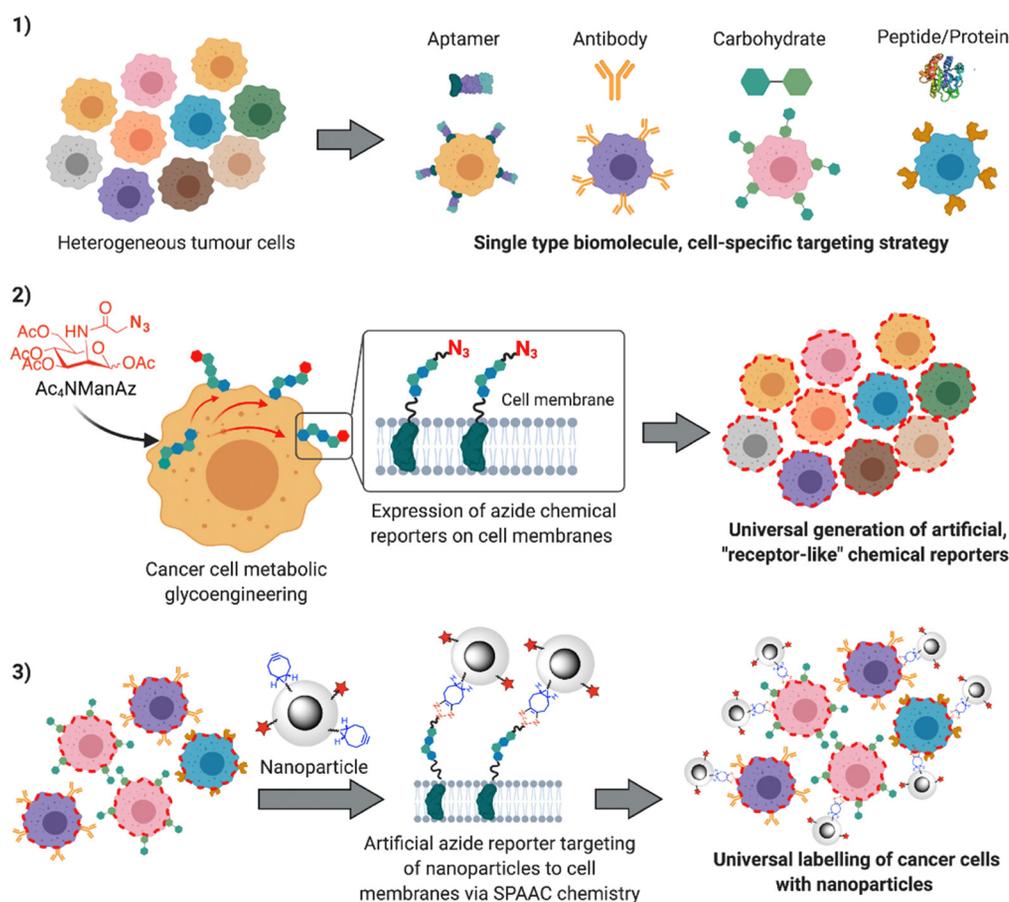


Figura 8. Etiquetado universal de células tumorales mediante glicoingeniería metabólica frente a métodos tradicionales basados en receptores específicos. Reproducido de la referencia 4, Idiago-López, J.; Moreno-Antolín, E.; de la Fuente, J. M.; Fratila, R. M. Nanoparticles and Bioorthogonal Chemistry Joining Forces for Improved Biomedical Applications. *Nanoscale Adv* 2021, 3, 1261–1292. Artículo publicado en acceso abierto bajo licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. No es necesario permiso para su reproducción.

Finalmente, más allá de las aplicaciones biomédicas concretas discutidas anteriormente, debido a su gran versatilidad, la química “click” y la química bioortogonal también se han utilizado ampliamente para otros fines, como la funcionalización de distintos tipos de NP con anticuerpos, aptámeros, péptidos e incluso con fármacos antitumorales o agentes de imagen.⁵³ Pero las posibles aplicaciones son prácticamente infinitas, y el único límite es nuestra imaginación. En nuestro laboratorio, por ejemplo, estamos trabajando en una línea de investigación basada en la inmovilización de nanopartículas magnéticas en membranas celulares a través de química bioortogonal con el fin de estudiar y modular la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular,⁵⁴ o de estimular mecanorreceptores.

CONCLUSIONES

La química bioortogonal ha desencadenado una auténtica revolución en varios campos, incluyendo la química, la biología y la biomedicina. Además, su combinación con la nanotecnología ha dado lugar a desarrollos impensables antes de su aparición. No obstante, el campo de la química bioortogonal no carece de limitaciones. Por ello, en nuestra opinión, en los próximos años seremos testigos de nuevos desarrollos, sobre todo en algunas direcciones concretas.

Por un lado, los químicos seguirán centrando sus esfuerzos en desarrollar nuevas reacciones bioortogonales, o en mejorar las cinéticas de reacción de las ya existentes y/o la estabilidad de los reactivos utilizados, sobre todo de cara a sus aplicaciones *in vivo*. Por otro lado, si se desea usar la química bioortogonal para visualizar pequeñas (bio)moléculas, como metabolitos o fármacos, es necesario usar sondas bioortogonales de muy pequeño tamaño, que introduzcan una mínima perturbación en el sistema a estudiar. Hemos indicado antes que la azida es una sonda bioortogonal ideal, pero también se han descrito nuevas moléculas con características adecuadas para actuar como sondas bioortogonales, por ejemplo los ciclopropanos.⁵⁵

También se ha constatado un interés creciente por el desarrollo de reacciones bioortogonales que fueran ortogonales entre sí, permitiendo así el uso en tándem de dos o más reacciones bioortogonales.^{32,55} Por último, la química bioortogonal también se puede emplear para la liberación controlada de moléculas, concepto conocido como “*click-to-release*” (“clic para liberar”). Este concepto utiliza un grupo bioortogonal para enmascarar un grupo funcional, por ejemplo, un alcohol o una amina, que se libera tras la reacción del grupo bioortogonal con su respectiva pareja.³²

Finalmente, en el ámbito de la química bioortogonal en combinación con la nanotecnología, los principales retos a

afrontar están relacionados con la obtención de nanopartículas funcionales. Por un lado, la funcionalización con sondas bioortogonales no debe comprometer la estabilidad coloidal de las nanopartículas en medios acuosos, lo cual no es trivial si la sonda bioortogonal tiene un carácter hidrofóbico. Por otro lado, la funcionalización se ha de llevar a cabo de tal manera que el grupo bioortogonal mantenga su accesibilidad para reaccionar. Este aspecto puede ser difícil de alcanzar si la nanopartícula está funcionalizada también con algún tipo de agente estabilizante de mayor tamaño (por ejemplo, polietilenglicol) necesario para su uso *in vivo*.⁵

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación del Gobierno de Aragón mediante la convocatoria de subvenciones destinadas a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2017-2021 cofinanciadas con el Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020. Asimismo, se agradece la financiación del Ministerio de Innovación, Ciencia y Universidades (MCIU, proyecto PGC2018-096016-B-I00), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) y FSE/Agencia Estatal de Investigación (subprograma Ramón y Cajal, RYC-2015-17640).

REFERENCIAS

1. Nobel Prize website. (accessed 2023-01-04).
2. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
3. Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (1), 13–21.
4. Pearce, O. M. T.; Läubli, H. Sialic Acids in Cancer Biology and Immunity. *Glycobiology* **2016**, *26* (2), 111–128.
5. Idiago-López, J.; Moreno-Antolín, E.; de la Fuente, J. M.; Fratila, R. M. Nanoparticles and Bioorthogonal Chemistry Joining Forces for Improved Biomedical Applications. *Nanoscale Adv* **2021**, *3* (5), 1261–1292.
6. Griffin, R. J. The Medicinal Chemistry of the Azido Group. In *Progress in medicinal chemistry*; NETHERLANDS, 1994; Vol. 31, pp 121–232.
7. Du, J.; Meledeo, M. A.; Wang, Z.; Khanna, H. S.; Paruchuri, V. D. P.; Yarema, K. J. Metabolic Glycoengineering: Sialic Acid and Beyond. *Glycobiology* **2009**, *19* (12), 1382–1401.
8. Ying, L.; Xu, J.; Han, D.; Zhang, Q.; Hong, Z. The Applications of Metabolic Glycoengineering. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*.
9. Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In

- Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science (1979)* **2008**, *320* (5876), 664–667.
10. Moons, S. J.; Adema, G. J.; Derks, M. T.; Boltje, T. J.; Büll, C. Sialic Acid Glycoengineering Using N-Acetylmannosamine and Sialic Acid Analogs. *Glycobiology* **2019**.
 11. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science (1979)* **2000**, *287* (5460), 2007–2010.
 12. Staudinger, H.; Hauser, E. Über Neue Organische Phosphorverbindungen IV Phosphinimine. *Helv Chim Acta* **1921**, *4* (1), 861–886.
 13. Chang, P. v.; Prescher, J. A.; Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. Imaging Cell Surface Glycans with Bioorthogonal Chemical Reporters. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (27), 8400–8401.
 14. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676.
 15. Rostovtsev, V. v.; Green, L. G.; Fokin, V. v.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process Catalyzed by Copper (I): Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
 16. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057–3064.
 17. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed Engl* **1963**, *2* (10), 565–598.
 18. Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolor, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. Cellular Consequences of Copper Complexes Used To Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (44), 17993–18001.
 19. Wittig, G.; Krebs, A. Zur Existenz Niedergliedriger Cycloalkane. *J. Chem Ber* **1961**, *94* (12), 3260–3275.
 20. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
 21. Debets, M. F.; van Hest, J. C. M.; Rutjes, F. P. J. T. Bioorthogonal Labelling of Biomolecules: New Functional Handles and Ligation Methods. *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (38), 6439–6455.
 22. Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (43), 23084–23105.
 23. Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (41), 13518–13519.
 24. Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjug Chem* **2008**, *19* (12), 2297–2299.
 25. Rondon, A.; Degoul, F. Antibody Pretargeting Based on Bioorthogonal Click Chemistry for Cancer Imaging and Targeted Radionuclide Therapy. *Bioconjug Chem* **2020**, *31* (2), 159–173.
 26. Fairbanks, B. D.; Macdougall, L. J.; Mavila, S.; Sinha, J.; Kirkpatrick, B. E.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. Photoclick Chemistry: A Bright Idea. *Chem Rev* **2021**, *121* (12), 6915–6990.
 27. Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. Chemical Remodelling of Cell Surfaces in Living Animals. *Nature* **2004**, *430* (August), 873–878.
 28. Laughlin, S. T.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Caenorhabditis Elegans Glycans. *ACS Chem Biol* **2009**, *4* (12), 1068–1072.
 29. Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulderson, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375–3378.
 30. Rondon, A.; Degoul, F. Antibody Pretargeting Based on Bioorthogonal Click Chemistry for Cancer Imaging and Targeted Radionuclide Therapy. *Bioconjug Chem* **2020**, *31* (2), 159–173.
 31. Patra, M.; Zarschler, K.; Pietzsch, H.-J.; Stephan, H.; Gasser, G. New Insights into the Pretargeting Approach to Image and Treat Tumours. *Chem Soc Rev* **2016**, *45* (23), 6415–6431.
 32. Devaraj, N. K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent Sci* **2018**, acscentsci.8b00251.
 33. Mejia Oneto, J. M.; Khan, I.; Seebald, L.; Royzen, M. In Vivo Bioorthogonal Chemistry Enables Local Hydrogel and Systemic Pro-Drug To Treat Soft Tissue Sarcoma. *ACS Cent Sci* **2016**, *2* (7), 476–482.
 34. Xie, X.; Li, B.; Wang, J.; Zhan, C.; Huang, Y.; Zeng, F.; Wu, S. Tetrazine-Mediated Bioorthogonal System for Prodrug Activation, Photothermal Therapy, and Optoacoustic Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (45), <https://www.shasqi.com>
 35. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04106492>
 36. Richard P. Feynman. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng Sci* **1960**, *23*, 22–35
 37. Roduner, E. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. *Chem Soc Rev* **2006**, *35* (7), 583.
 38. Whitesides, G. M. The “right” Size in Nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* **2003**, *21* (10), 1161–1165.
 39. Terai, T.; Nagano, T. Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12* (5), 515–521.
 40. Bernardin, A.; Cazet, A.; Guyon, L.; Delannoy, P.; Vinet, F.; Bonnaffé, D.; Texier, I. Copper-Free Click Chemistry for Highly Luminescent Quantum Dot Conjugates: Application to in Vivo Metabolic Imaging. *Bioconjug Chem* **2010**, *21* (4), 583–588.
 41. Hsieh, F.-J.; Sotoma, S.; Lin, H.-H.; Cheng, C.-Y.; Yu, T.-Y.; Hsieh, C.-L.; Lin, C.-H.; Chang, H.-C. Bioorthogonal Fluorescent Nanodiamonds for Continuous Long-Term Imaging and Tracking of Membrane Proteins. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (22), 19774–19781.
 42. Liu, R.; Zhao, J.; Han, G.; Zhao, T.; Zhang, R.; Liu, B.; Liu, Z.; Zhang, C.; Yang, L.; Zhang, Z. Click-Functionalized SERS Nanoprobes with Improved Labeling Efficiency and Capability for Cancer Cell Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9* (44), 38222–38229.
 43. Lee, S.; Yoon, H. I.; Na, J. H.; Jeon, S.; Lim, S.; Koo, H.; Han, S.-S.; Kang, S.-W.; Park, S.-J.; Moon, S.-H.; Park, J. H.; Cho, Y. W.; Kim, B.-S.; Kim, S. K.; Lee, T.; Kim, D.; Lee, S.; Pomper, M. G.; Kwon, I. C.; Kim, K. In Vivo Stem Cell Tracking with Imageable Nanoparticles That Bind Bioorthogonal Chemical Receptors on the Stem Cell Surface. *Biomaterials* **2017**, *139*, 12–29.
 44. Haun, J. B.; Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S. A.; Lee, H.; Weissleder, R. Bioorthogonal Chemistry Amplifies Nanoparticle Binding and Enhances the Sensitivity of Cell Detection. *Nat Nano* **2010**, *5* (9), 660–665
 45. Peterson, V. M.; Castro, C. M.; Lee, H.; Weissleder, R. Orthogonal Amplification of Nanoparticles for Improved Diagnostic Sensing. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3506–3513.
 46. Liong, M.; Fernandez-Suarez, M.; Issadore, D.; Min, C.; Tassa, C.; Reiner, T.; Fortune, S. M.; Toner, M.; Lee, H.; Weissleder, R. Specific Pathogen Detection Using Bioorthogonal Chemistry and Diagnostic Magnetic Resonance. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (12), 2390–2394. <https://doi.org/10.1021/bc200490r>
 47. Idiago-López, J.; Moreno-Antolín, E.; Eceiza, M.; Aizpurua, J. M.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M.; Fratila, R. M. From Bench to Cell: A Roadmap for Assessing the Bioorthogonal “Click” Reactivity of Magnetic Nanoparticles for Cell Surface Engineering. *Bioconjug Chem* **2022**, *33* (9), 1620–1633.
 48. Koo, H.; Lee, S.; Na, J. H.; Kim, S. H.; Hahn, S. K.; Choi, K.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y.; Kim, K. Bioorthogonal Copper-Free Click Chemistry in Vivo for Tumor-Targeted Delivery of Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (47), 11836–11840.

50. Lee, S.; Koo, H.; Na, J. H.; Han, S. J.; Min, H. S.; Lee, S. J.; Kim, S. H.; Yun, S. H.; Jeong, S. Y.; Kwon, I. C.; Choi, K.; Kim, K. **Chemical Tumor-Targeting of Nanoparticles Based on Metabolic Glycoengineering and Click Chemistry.** *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2048–2063.
51. Hapuarachige, S.; Kato, Y.; Artemov, D. **Bioorthogonal Two-Component Drug Delivery in HER2(+) Breast Cancer Mouse Models.** *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 24298.
52. Lee, S. H.; Park, O. K.; Kim, J.; Shin, K.; Park, C. G.; Kim, K.; Ko, G.; Lee, N.; Kwon, S.-H.; Hyeon, T. **Deep Tumor Penetration of Drug-Loaded Nanoparticles by Click Reaction-Assisted Immune Cell Targeting Strategy.** *J Am Chem Soc* **2019**, *141* (35), 13829–13840.
53. Taïariol, L.; Chaix, C.; Farre, C.; Moreau, E. **Click and Bioorthogonal Chemistry: The Future of Active Targeting of Nanoparticles for Nanomedicines?** *Chem Rev* **2021**, acs.chemrev.1c00484.
54. Francisco Javier Idiago López. Tesis Doctoral - Unión Covalente de Nanopartículas Magnéticas a Membranas Celulares Para La Modulación de Sus Propiedades Biofísicas Con Hipertermia Localizada, Universidad de Zaragoza, 2022.
55. Row, R. D.; Prescher, J. A. **Constructing New Bioorthogonal Reagents and Reactions.** *Acc Chem Res* **2018**, *51* (5), 1073–1081.

BIBLIOGRAFÍA ESENCIAL

Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. **Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.** *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (11), 2004–2021.

Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. **Chemistry in Living Systems.** *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (1), 13–21.

Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. **From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions.** *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676.

Devaraj, N. K. **The Future of Bioorthogonal Chemistry.** *ACS Cent Sci* **2018**, acscentsci.8b00251.

Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C. **To View Your Biomolecule, Click inside the Cell.** *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (43), 23084–23105.

Idiago-López, J.; Moreno-Antolín, E.; de la Fuente, J. M.; Fratila, R. M. **Nanoparticles and Bioorthogonal Chemistry Joining Forces for Improved Biomedical Applications.** *Nanoscale Adv* **2021**, *3* (5), 1261–1292.