

KÉMIAI NOBEL-DÍJ, 2022 – A KLIKK-REAKCIÓ ÉS ALKALMAZÁSA

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 2022 – DEVELOPMENT OF CLICK CHEMISTRY

Kele Péter¹, Novák Zoltán²

¹PhD, Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémiai Intézet Kémiai Biológia Kutatócsoport, Budapest
kele.peter@ttk.hu

²DSc, egyetemi tanár, Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémiai Intézet Katalízis és Szerves Szintézisek Kutatócsoport, Budapest
novakz@ttk.elte.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

2022-ben a klikk-kémia és a bioortogonális kémiai kidolgozásáért ítelték oda a kémiai Nobel-díjat. Ezek a rendkívül egyszerű, könnyen kivitelezhető és hatékony szerves kémiai átalakítások számos új kémiai és biológiai alkalmazást tettek lehetővé kidolgozásukat követően. A rövid irodalmi összefoglalóban bepillantást nyújtunk a klikk-kémiába a szerves kémiai alapoktól kezdve a biológiai alkalmazásokig. Az alapvető szerves kémiai átalakítások ismertetésén és csoportosításán túl bemutatásra kerülnek azok a fejlesztések, amelyek biológiai rendszerekben is alkalmazhatóak molekuláris szintű jelölésre.

ABSTRACT

The development of click chemistry and bioorthogonal chemistry was awarded by Nobel Prize in Chemistry in 2022. These extremely simple and efficient organic chemical transformations gained several new chemical and biological applications since their development. In this short literature review, we provide an insight into click chemistry starting from the organic chemistry basics to their biological applications in addition to description and classification of the key organic transformations, developments applied to molecular labeling in biological systems are also presented.

Kulcsszavak: klikk-reakció, bioortogonális kémia, Nobel-díj

Keywords: click reaction, bioorthogonal chemistry, Nobel prize

A KLIKK-REAKCIÓ

A 2022. évben a kémiai Nobel-díjat megosztva Carolyn R. Bertozzi (Amerikai Egyesült Államok), a Stanford University professzora, Morten Meldal (Dánia), a University of Copenhagen professzora és K. Barry Sharpless (Amerikai Egyesült Államok), a Scripps Research professzora kapta a „klikk-kémia”, valamint a bio-ortogonális kémia kidolgozásáért. Érdekességként megemlítendő, hogy Sharpless már 2001-ben elnyerte a kémiai Nobel-díjat a katalitikus aszimmetrikus szintézisek kidolgozásáért.

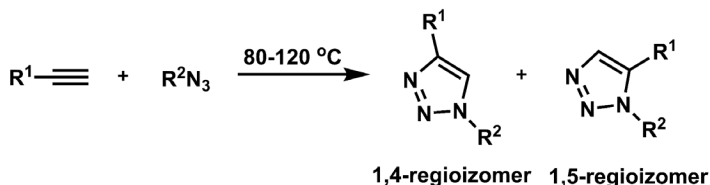
A szerves kémiai szintézisek során változatos szerkezettel rendelkező anyagokat hozhatunk létre új kémiai kötések kialakításával. Ennek megvalósításához a szerves kémikusoknak egy folyamatosan fejlődő szerves kémiai eszköztárra van szükségük, amelynek felhasználásával mind hatékonyabban tudják a megfelelő szén–szén és szén–heteroatom kötések kialakítani egy-egy molekuláris építkezés során. Ezek a kémiai eszközök valójában különböző átalakításokat jelentenek, amelyek számos esetben valamilyen katalizátor alkalmazására épülnek. Az ilyen szintetikus eszközök mellett természetesen szükség van különböző építőelemekre, kémiai reaktánsokra is, amelyek a megfelelő kémiai tulajdonságokkal, molekuláris motívumokkal rendelkeznek annak érdekében, hogy egy jól megválasztott folyamatban átalakíthatóak legyenek. A 2022-es Nobel-díjat olyan átalakítás kidolgozásáért és alkalmazásáért adták a megalkotóinak, amelynek segítségével speciális molekuláris egységeken, az úgynevezett funkciós csoportokon keresztül két reaktáns nagy hatékonysággal és szelektivitással kapcsolható össze anélkül, hogy melléktermékek keletkeznének a folyamat során, megteremtve ezzel a biológiai alkalmazások lehetőségét is. Az egyik idei díjazott, K. Barry Sharpless professzor, munkája során az ilyen típusú reakciókat *klikk-reakciónak* nevezte el, és ezekkel a reakciókkal szemben szigorú kritériumokat fogalmazott meg, annak érdekében, hogy egy kémiai reakcióról és a szintetikus eljárásról eldönthető legyen, hogy besorolható-e ebbe az osztályba, vagy sem (Kolb et al., 2001, 40.). Fontos, hogy változatos építőelemek álljanak rendelkezésre egy-egy reakcióhoz, mivel ez biztosítja majd a kémiai diverzitást. Kiemelten fontos a reakciók hatékonysága az átalakulás mértékére és szelektivitására vonatkozóan, és ebből a szempontból csak a nagyobb méretben is megvalósítható, kiváló kémiai termelést biztosító eljárások jöhetnek szóba. Ez egyben azt is magában foglalja, hogy a klikk-kémia során szelektíven csak egy termék keletkezik (enantiomerek keletkezése megengedett, azaz ezeknek a reakcióknak nem szükséges sztereoselektívnek lenniük), így a reakcióelegyek feldolgozása nem igényli a melléktermékek kromatográfiás eljárással történő tisztítását (a kromatográfiás tisztítás gyakran alkalmazott hatékony módszer a végtermékek reakcióelegyből történő kinyerésére, azonban oldószerigényes, és sokszor hosszadalmas eljárás). A reakció körülményeire vonatkozóan megfogalmazták, hogy ideális esetben az átalakulásnak a reakcióban

jelen levő vízre és oxigénre nem szabad érzékenynek lennie, tehát speciális reakciókörülmények biztosítása nem szükséges ezeknél az átalakításoknál, sőt előnyt jelent, ha a kémiai reakció vízben mint reakcióközegben is kivitelezhető, sőt az oldószermentes reakciók kiemelt előnyt élveznek ilyen tekintetben. A klikk-reakciókkal szemben elvárás továbbá, hogy a reakciókban keletkező terméknek fiziológiás körülmények között stabilnak kell lennie, hiszen ezek a kémiai eszközök a gyógyszerkémiai felhasználhatóságot célozzák meg. Az átalakítások követelményrendszerében megfogalmazott paraméterek és kritériumok a reakciók energetikai tulajdonságaira vezethetők vissza, és általánosságban elmondható, hogy a klikk-reakciót jellemzően legalább 20 kcal/mol energianyereséggel lejátszódó reakciók alkotják, melyek alacsony aktiválási energia mellett valósulhatnak meg, tehát kinetikai és termodinamikai szempontból is igen kedvezőek ezek a folyamatok.

A kémiai reakciók és funkciós csoportok szerint csoportosítva a leggyakoribb klikk-reakciók a következők: a) telítetlen vegyületek cikloaddíciós reakciói, különös tekintettel az 1,3-dipoláris vegyületekre; b) a feszített gyűrűs heterociklusos elektrofil rendszerek, mint például az epoxidok, aziridinek, aziridiniumionok nukleofil szubsztitúciós reakcióban történő gyűrűnyitási reakciója; c) szén–szén többszörös kötésekre történő addíció, különösen oxidatív körülmények között, mint például epoxidáció, dihidroxilálás és aziridinálás, valamint a Michael-addíció, vagy a tiol-én, illetve tiol-in addíció.

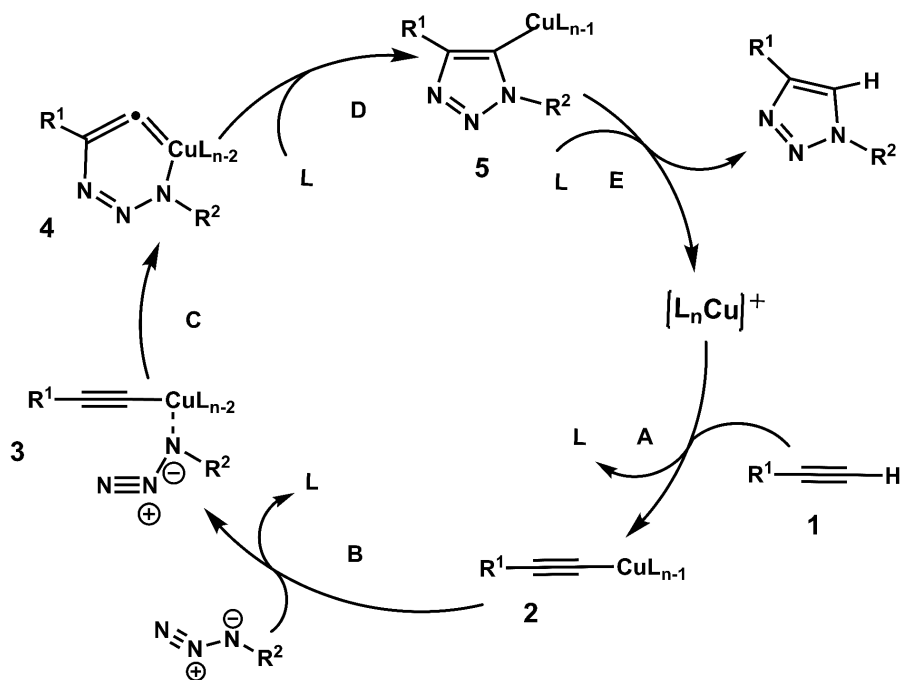
Az előzőekben felsorolt átalakítások közül az első csoportba tartozik az alkinok és azidok nagy stabilitású triazol gyűrű kialakulásával járó 1,3-dipoláris cikloaddíciója mint a legismertebb klikk-kémiai átalakítás. Ennek köszönhetően, sokszor és egyben tévesen is, sokan ezt az egy átalakítást nevezik klikk-reakciónak. A kémiai reakciónak az egyik előnye, hogy a triazol gyűrű kialakulásához szükséges molekuláris kapcsolódási pontok, az azid és alkin funkciós csoportok könnyen beépíthetők a szerves molekulákba. Ezek a csoportok valójában nagy energiával rendelkeznek, azonban kinetikus stabilitásuknak köszönhetően a kevésbé reaktív funkciós csoportok közé tartoznak, ezért viszonylag inertnek tekinthetők. Ez a tulajdonságuk később a bioortogonalitás tekintetében nagyon előnyösnek bizonyult, hiszen élő rendszerekben is kellően stabilak ezek a csoportok, és szinte csak egymással reagálnak. Azonban az alacsony reaktivitás problematikájának megoldásához több fejlesztési lépésnek meg kellett történnie a kutatások során. Az eredeti cikloaddíciós reakciót 1961-ben írta le először Rudolf Huisgen (Huisgen, 1986). A Huisgen-féle cikloaddíciós reakció néven elismert reakció csak magas hőmérsékleten (80–120 °C-on) adja az 1,4 és 1,5 helyzetben szubsztituált triazolok 1:1 arányú keverékét.

A szelektivitás hiánya az aktiválási energiák hasonlóságával magyarázható, mivel mindkét izomer keletkezése exoterm folyamat közel azonos energiával (–60,8 és –60,6 kcal/mol). Ezek az energetikai tulajdonságok tehát kedvezőtlenek mind a klikk-kémia, mind pedig a biológiai alkalmazások szempontjából.



1. ábra. A Huisgen-féle 1,3-dipoláris cikloaddíció (a szerzők szerkesztése)

Az első áttörést a katalízis eredményezte, amikor is felfedezték, hogy réz(I) vegyületek jelenlétében, az azid és alkin funkciós csoportok között lejátszódó cikloaddíció gyorsabbá és regioszelektívvé tehető, mivel az 1,4 triazol izomer keletkezése 10^7 -szer gyorsabb a katalitikus körülmények között. Az azidok és acetilének réz(I)-sók által katalizált reakciójáról egymástól függetlenül számolt be Sharpless (Rostovtsev et al., 2002, 41.) és a 2022-es év másik díjazottja, Morten Meldal (Tornøe et al., 2002, 67.) kutatócsoportja 2002-ben. Munkájuk során a reakcióhoz szükséges réz(I)-sót általában réz(II)-szulfát nátrium-aszkorbát segítségével történő *in situ* redukciójával generálták. Ezenkívül természetesen számos más rézforrás is alkalmazható katalizátorként, mint például egyes réz(I)-sók és különböző ligandumokkal alkotott rézkomplexek.



2. ábra. A rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció mechanizmusa (a szerzők szerkesztése)

A Sharpless által javasolt mechanizmus szerint a rézkatalizált cikloaddíciós reakció a következőképpen játszódhat le (2. ábra) (Himo et al., 2005, 127). A terminális acetilén (1) és a komplexált réz(I) ion között kialakuló π -komplex hatására csökken az alkin pK_a érték, ennek következtében az acetilén *sp* hidrogénje már elég savassá válik, hogy deprotonálódjon, és még a vizes közegben is kialakuljon a stabilis réz-acetilid (2).

Az így keletkezett réz-acetilidről a következő lépésben (B) a szerves azid leszorít egy ligandumot a rézről, majd létrejön a kötés a nitrogén és a rézatom között a 3-as közttermék kialakulása közben. Ezután az azid távolabbi nitrogénje támad az acetilid C-2 szénatomjára, és kialakul egy hattagú réz(III) metallaciklus (4). Ennek a lépésnek az aktiválási energiája 14,9–18,7 kcal/mol, amely jóval alacsonyabb, mint a katalizátor nélkül végzett reakció energiagátja (25,7 és 26,0 kcal/mol). Az intramolekuláris ciklizáció (C) után a gyűrű rövidülésével létrejön egy réz-triazolil-származék (5). Végül a réz-triazol protonálódása következtében kialakul a szubsztituált triazol, és visszakapjuk a katalizátor aktív formáját.

A katalitikus folyamat új szintetikus lehetőségeket nyitott meg, és az azid és alkin funkciós csoportok között lejátszódó klikk-reakció robbanásszerű fejlődésnek indult, és számos alkalmazást nyert különböző területeken. A kutatások számára a triazolokat nemcsak könnyű előállíthatóságuk tette fontossá, hanem a biológiai és gyógyszeripari alkalmazhatóságuk is, ugyanis a triazol gyűrű stabilitása és a peptid-kötéshez való hasonlósága alkalmassá teszi triazol gyűrűt tartalmazó peptidek és oligoszacharidok előállítására és biológiai célú felhasználására. Ezenkívül előállítottak belőle dendrimereket, műanyagokat, folyadékkristályokat és fluoreszcens jelzőmolekulákat is.

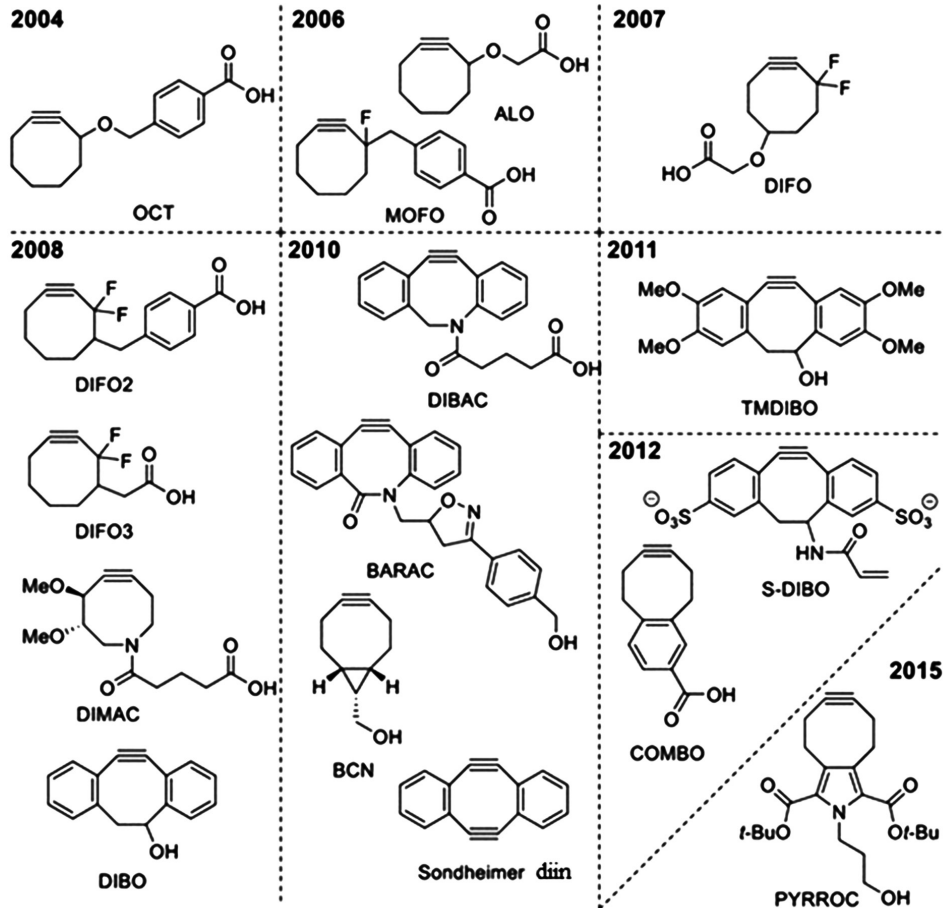
KÉMIAI BIOLÓGIA ÉS A KLIKK-REAKCIÓ

A kémiai biológia tudománya a szintetikus kémia eszközeivel vizsgálja az élő sejtekben lejátszódó komplex folyamatokat úgy, hogy a kiválasztott biomolekulákat kis, szintetikus vegyületekkel módosítja. CuAAC-reakció adta lehetőségek igen csábítók, hiszen gyorsan, kiváló hozammal eredményezik a céltermékeket. Sajnos, a katalizátorként alkalmazott rézionok mérgező hatása miatt a reakció élő sejtekben való alkalmazása erősen korlátozott. Történetek ugyan próbálkozások arra, hogy a Cu(I)-ionokat a katalitikus tulajdonság megtartása mellett különféle ligandumokkal „ártalmatlanítsák”, ám ezek a megoldások nem terjedtek el a klikk-kémiát biológiai rendszerekben alkalmazni akaró kutatók körében (Li et al., 2017, 2107).

A fehérjék kémiai módosítására alkalmas közismert eljárások, mint a nukleofil tulajdonságokkal rendelkező aminosavakat célzó megoldások, általánosan elter-

jedtek a biológiai rendszereket a kémia eszközével vizsgáló kutatók között. Ezek a megoldások azonban csekély specificitással rendelkeznek. Némileg növelhető a kémiai módosítás szelektivitása, ha specifikus reaktivitással rendelkező aminosav-oldalláncokat (Trp, Tyr) vesznek célba, ám ezek általában csak egyedi megoldásokat tesznek lehetővé. Mennyivel jobb lenne, ha képesek lennének egy általunk kiszemelt biomolekulát (például: fehérjét, szénhidrátot) esetleg azon belül is egy adott pozíciót kémiaiilag módosítani! Sok kutató törte a fejét a lehetséges megoldáson, köztük a 2022-es év harmadik kémiai Nobel-díjasa Carolyn R. Bertozzi is, amikor egy merőben új megközelítést javasolt: az élő rendszerekben megtalálható funkciós csoportok helyett használjunk nemtermészetes kémiai motívumokat! Olyan csoportokat, amelyek amellet, hogy biológiaiilag és kémiaiilag is inertek, azaz nem mérgezők és nem reagálnak, a természetes funkciókkal szelektív reakcióba vihetők egymással. Bertozzi sikeresen azonosított is egy ilyen reakciót, amely azidok Staudinger-féle redukcióján alapul. Olyan, a redukciós lépésben részt vevő foszfán-származékokat fejlesztett ki, amelyek egy elektrofil csapdát tartalmaztak, így alkalmasak a redukciós lépésben keletkező reaktív intermedierek intramolekuláris befogására stabil kovalens kötés kiépülése mellett. További megoldandó feladat volt a cél biomolekulák – Bertozzi esetében a sejtek felszínén található szénhidrátok – előzetes módosítása az egyik ilyen nemtermészetes motívummal. Kísérletei során felismerte, hogy amennyiben egy aziddal módosított, a szénhidrátok felépítésére alkalmas származékot (*N*-azidoacetilmannózamint) ad a sejtek tápoldatához, az a sejtek metabolizmusa segítségével azidoszialátként beépül a felszíni glikánstruktúrába. Az azóta Staudinger–Bertozzi-féle ligációs eljárásaként ismert módszer hatékonyságát számos példán demonstrálta (Saxon et al., 2000, 2007.). Bár az azidok és elektrofil csapdát tartalmazó foszfánok reakciója sok szempontból megfelel a Sharpless-által definiált klikk-kémiai feltételeknek, a reakció sebessége hagyott maga után kívánnivalót. Történetesen az azidcsoport a CuAAC-reakciók egyik résztvevője is. Ráadásul, a partner láncvégi alkin is nemtermészetes, kémiaiilag és biológiaiilag inert funkciós csoport, így Bertozzi is felfigyelt rá, és biztosan szívesen alkalmazta volna sejtek felszíni szénhidrátjainak tanulmányozására, ha nem lett volna ott a rézion. Egy 1953-as tanulmányban Alfred Blomquist leírta, hogy feszült gyűrűs cikloalkinok azidokkal robbanásszerű gyorsasággal reagálnak (Blomquist–Liu, 1953, 2153.). Bertozzi meglátta arra a lehetőséget ebben a reakcióban, hogy az azid-alkin reakciót biokompatibilissá tegye (Agard et al., 2004, 15046.). A hármas kötés gyűrűbe kényszerítése elegendő többletenergiaival látja el az alkin funkciós csoportot, így az rézionok nélkül is reakcióba lép azidokkal, akár fiziológiás körülmények közt is. Az így kivitelezett, a gyűrűfeszültség által hajtott azid-alkin cikloaddíciós (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) reakció ugyan nagyságrendekkel lassabban megy végbe, mint a rézzel katalizált verzió, az évek során a gyűrűfeszültség további növelésével vagy elektronszívó szubsztituensek segítségével

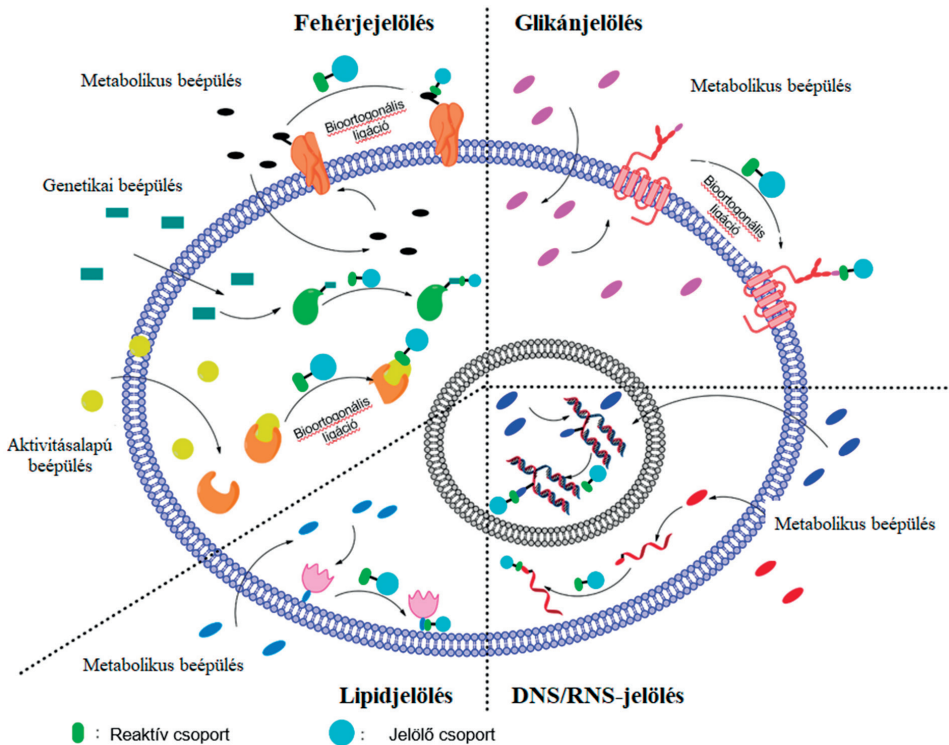
sikerült ezt feltornázní a rézkatalizált változatot megközelítı sebességre (3. ábra) (Dommerholt et al., 2016, 16.).



3. ábra. Megnövelt reaktivitású ciklooktén-származékok (Dommerholt et al., 2016 alapján)

Ciklookténok és azidok reakcióján kívül mára számos, szintén biokompatibilis, a klikk-kémia feltételeinek megfelelő kémiai átalakítást azonosítottak (Cserép et al., 2015, 042001.; Smeenk et al., 2021, 79.). Az összefoglaló néven bioortogonálisnak nevezett kémiai reakciók az átalakítások biokompatibilitására (bio) és kemoszelektivitására (ortogonális) utalnak (Prescher–Bertozzi, 2005, 13.; Sletten–Bertozzi, 2009, 6974.). A bioortogonális kémiai-biológiai megoldások általában kétlépéses sémát követnek (Patterson et al., 2014, 592.) Elsőként a cél biomolekula helyspecifikus bioortogonalizálása történik, majd ezt követi az ellenoldali

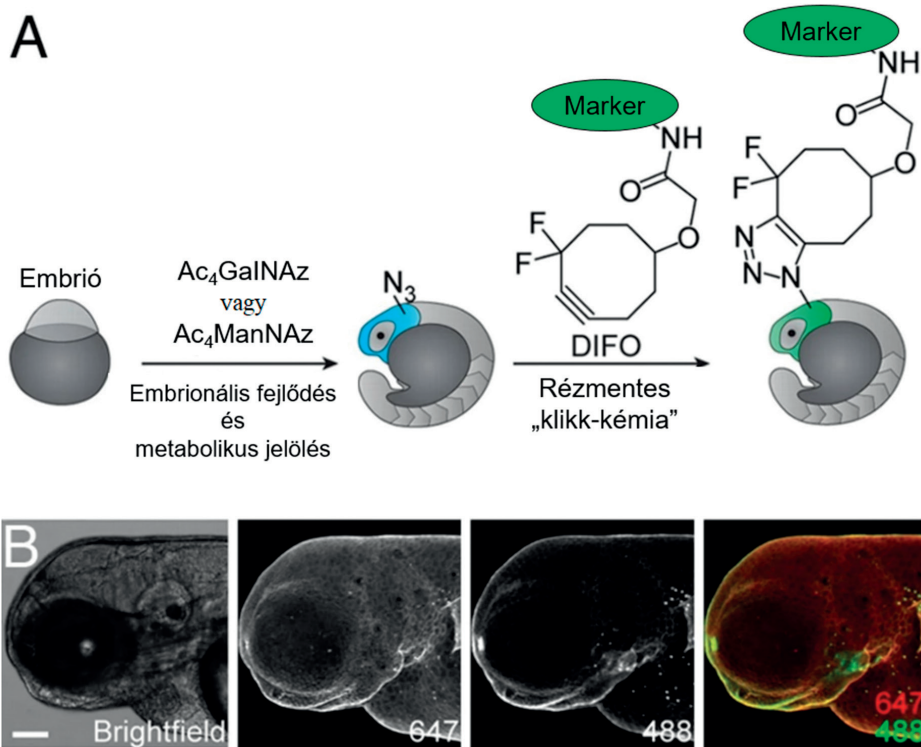
bioortogonális funkciós csoporttal ellátott módosító hozzáadása. Ez utóbbi lehet egy markervegyület (például: fluoreszcens jelzővegyület, mágneseesen aktív vagy pozitronemisszióra hajlamos nuklid) vagy egy specifikus biológiai/kémiai funkció is. A fentebb ismertetett, azido-cukrok metabolikus beépítésén alapuló, szénhidrátok kémiai módszerekkel való tanulmányozására alkalmas módszeren túl további lökést adott a bioortogonális kémia élő rendszerekben való alkalmazásához olyan technológiák fejlődése, amelyek még hatékonyabban és még jobb szelektivitással eredményezik a cél biomolekulák előzetes bioortogonalizálását.



4. ábra. A bioortogonális kémiai reakciók alkalmazási lehetőségei élő sejtekben (Li et al., 2016, 1393. alapján)

A fehérjék N- vagy C-terminálisához fuzionált, enzimaktivitással rendelkező címkék (például: Halo-, SNAP-, CLIP-tag) és a hozzájuk kötődő bioortogonalizált, például ciklooktinnal módosított szubsztrátok nagy megbízhatósággal alkalmazhatók a kiválasztott fehérjék láncvégi módosítására. A genetikai kód kiterjesztésén alapuló, nemtermészetes aminosavak helyspecifikus beépítésé-

re alkalmas módszerrel pedig megnyílt az út egy adott fehérje szinte bármely pontjának bioortogonális módosítására. Nukleinsavak általános, a metabolizmus segítségével történő, nemtermészetes nukleotidokkal való bioortogonalizálásán kívül lehetséges nemtermészetes építőelemek helyspecifikus beépítése például PCR-technológiával. Találhatunk példákat továbbá bioortogonalizált foszfolipidok kémiai biológiai alkalmazására is (4. ábra) (Hang et al., 2011, 699).



5. ábra. Glikánok vizsgálata bioortogonális kémiai módszerrel. (A) Fejlődésben levő zebradánio embriók glikánstruktúrájának bioortogonalizálása azidomannóz metabolikus beépítésével.

Az aziddal módosított sejtfelszíni szénhidrátok láthatóvá tétele fluoreszcensen jelzett ciklooktinnal. (B) Metabolikusan aziddal bioortogonalizált zebradánio embrió fluoreszcens jelzése Alexa-647 ciklooktin reagenssel, 60 órával a megtermékenyítés után. Három órával később az Alexa-488 ciklooktinnal történt kezeléssel láthatóvá válnak az újonnan szintetizált glikánstruktúrák (Laughlin–Bertozzi, 2009, 12.)

Bioortogonális megközelítésen alapuló kémiai biológiai alkalmazásokat elterjedten alkalmaznak a biológiai rendszerek feltérképezésére. Ezek a módszerek az egyszerű jelölésektől a proteinprofilozáson át a különböző képalko-

tó diagnosztikai eljárásokig széles körben elterjedtek (Scinto et al., 2021, 30.). Nagyszámú, bioortogonális kémiai megközelítésen alapuló tanulmány köthető Bertozzi nevéhez, amelyekben sejtek felszíni szénhidrát-struktúrájának szerepét vizsgálják fluoreszcens markerek segítségével, például az embrionális fejlődésben (5. ábra) (Laughlin et al., 2008, 664.; Laughlin–Bertozzi, 2009, 12.).

IRODALOM

- Agard, N. J. – Prescher, J. A. – Bertozzi, C. R. (2004): A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 15046–15047. DOI: 10.1021/Ja044996f, <https://tinyurl.com/2j8353sd>
- Blomquist, A. T. – Liu, L. H. (1953): Many-membered Carbon Rings. VII. Cyclooctyne. *Journal of the American Chemical Society*, 75, 2153–2154. DOI: 10.1021/Ja01105a039
- Cserép G. B. – Herner A. – Kele P. (2015): Bioorthogonal Fluorescent Labels: A Review on Combined Forces. *Methods and Applications in Fluorescence*, 3, 042001. DOI: 10.1088/2050-6120/3/4/042001, http://real.mtak.hu/36453/1/Cserep_Bioorthogonal_fluorescent_labels_nk1_u.pdf
- Dommerholt, J. – Rutjes, F. P. J. T. – Van Delft, F. L. (2016): Strain-Promoted 1,3–Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Topics in Current Chemistry (Z)*, 374, 16. DOI: 10.1007/S41061-016-0016-4, <https://link.springer.com/article/10.1007/s41061-016-0016-4>
- Hang, H. C. – Wilson, J. P. – Charron, G. (2011): Bioorthogonal Chemical Reporters for Analyzing Protein Lipidation and Lipid Trafficking. *Accounts of Chemical Research*, 44, 699–708. DOI: 10.1021/Ar200063v, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4231477/>
- Himo, F. – Lovell, T. – Hilgraf, R. et al. (2005): Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 210. DOI: 10.1021/ja0471525, <https://tinyurl.com/2wtu3bjf>
- Huisgen, R. (1986): 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. In.: Padwa, A. (ed.): *1,3-Dipolar Cycloadditional Chemistry*. Wiley: New York, DOI: 10.1002/Jhet.5570230658
- Kolb, H. C. – Finn, M. G. – Sharpless, K. B. (2001): Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004. DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5, <https://tinyurl.com/bdhat5x7>
- Laughlin, S. T. – Baskin, J. M. – Amacher, S. L. et al. (2008): In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science*, 320: 664–667. DOI: 10.1126/Science.1155106, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701225/>
- Laughlin, S. T. – Bertozzi, C. R. (2009): Imaging the Glycome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 12–17. DOI: 10.1073/Pnas.0811481106, <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0811481106>
- Li, S. – Wang, L. – Yu, F. et al. (2017): Copper-Catalyzed Click Reaction on/in Live Cells. *Chemical Science*, 8, 2107–2114. DOI: 10.1039/C6SC02297A, <https://pubs.rsc.org/en/content/article-landing/2017/sc/c6sc02297a>
- Li, L. – Zhang, Z. (2016): Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Molecules*, 21, 10, 1393. DOI: 10.3390/Molecules21101393

- Patterson, D. M. – Nazarova, L. A. – Prescher, J. A. (2014): Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chemical Biology*, 9, 592–605. DOI: 10.1021/Cb400828a, https://www.researchgate.net/publication/259804118_Finding_the_Right_Bioorthogonal_Chemistry
- Prescher, J. A. – Bertozzi, C. R. (2005): Chemistry in Living Systems. *Nature Chemical Biology*, 1, 13–21. DOI: 10.1038/Nchembio0605-13
- Rostovtsev, V. V. – Green, L. G. – Fokin, V. V. et al. (2002): A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 2596. DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4
- Saxon, E. – Bertozzi, C. R. (2000): Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science*, 287, 2007–2010. DOI: 10.1126/Science.287.5460.2007
- Scinto, S. L. – Bilodeau, D. A. – Hincapie, R. et al. (2021): Bioorthogonal Chemistry. *Nature Reviews Methods Primers*, 1: 30. DOI: 10.1038/S43586-021-00028-Z
- Sletten, E. M. – Bertozzi, C. R. (2009): Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie International Edition*, 48: 6974–6998. DOI: 10.1002/Anie.200900942, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864149/>
- Smeenk, M. L. W. J. – Agramunt, J. – Bongers, K. M. (2021): Recent Developments in Bioorthogonal Chemistry and the Orthogonality Within. *Current Opinion in Chemical Biology*, 60: 79–88. DOI: 10.1016/J.Cbpa.2020.09.002, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136759312030123X>
- Tornøe, C. W. – Christensen, C. – Meldal, M. (2002): Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67, 3057–3064. DOI: 10.1021/Jo011148j, https://dg.dk/wp-content/uploads/2022/10/fig2_ke_en_22_clickReaction.pdf