



逆电子需求的狄尔斯-阿尔德反应在生物正交化学领域的发展与应用

张贤睿¹, 罗惠鑫¹, 樊新元^{1,2,*}, 陈鹏^{1,2*}

1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

2. 北京分子科学国家研究中心, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: xinyuanfan@pku.edu.cn; pengchen@pku.edu.cn

收稿日期: 2020-06-29; 接受日期: 2020-08-04; 网络版发表日期: 2020-09-28

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0501500, 2019YFA0904201)和国家自然科学基金(编号: 91753000, 21740001, 91957101, 21708020)资助项目

摘要 逆电子需求的狄尔斯-阿尔德(IEDDA)反应由于其生物兼容性好、反应专一性高、反应速率快等优点逐渐成为最受关注的生物正交化学反应。因此, 研究者围绕IEDDA反应, 从包括反应机理、底物合成、效率优化以及反应应用等多个角度进行了深入研究与探索, 开发了分别用于生物正交偶联和生物正交断键的IEDDA反应。本文首先从反应的发展和优化角度对IEDDA反应进行了介绍, 随后归纳总结了IEDDA分别作为偶联反应和断键反应在生物大分子标记、药物运输、药物动力学研究、蛋白质调控与功能激活、前药释放、siRNA激活以及RNA固相纯化等领域的生物应用。最后, 对IEDDA反应的进一步研究与应用进行了展望, 期待通过对更优反应的开发以及更广泛生物应用的探索, 将生物正交化学的发展与应用推进到一个新的高度。

关键词 逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应, 生物正交化学, 生物正交断键反应, 生物分子标记, 蛋白质激活

1 引言

1927年, 狄尔斯(Diels)与阿尔德(Alder)师生第一次报道了发生在富电子双烯体和缺电子亲双烯体之间的[4+2]环加成反应, 又名狄尔斯-阿尔德(DA)反应^[1], 该反应吸引了众多研究者的研究兴趣, 也为二位发现者赢得了1950年的诺贝尔化学奖。与之相反, 发生在缺电子双烯体和富电子亲双烯体之间的[4+2]环加成反应被称为逆电子需求的狄尔斯-阿尔德反应(inverse electron demand Diels-Alder reaction, IEDDA)。由于缺电子双烯体通常含有杂原子, 而反应产物又为六元环,

因此该反应常被用在含有杂原子六元环的天然产物的化学合成中^[2]。

随着化学生物学研究的兴起, 生物正交反应的开发逐渐成为人们关注的焦点。2008年, Fox课题组^[3]报道了环张力的反式环辛烯亲双烯体与四嗪化合物(双烯体)在生物兼容条件下的快速偶联反应, 几乎在同一时期Hilderbrand课题组^[4]报道了降冰片烯与四嗪的偶联反应并将其应用于生物大分子的荧光标记, 自此开启了IEDDA作为生物正交偶联反应的研究与探索。

2013年, Robillard课题组^[5]在前体药物开发中发现特定结构的反式环辛烯可以作为氨基的保护基, 在与

引用格式: Zhang X, Luo H, Fan X, Chen PR. Development and applications of inverse-electron-demand Diels-Alder reaction in bioorthogonal chemistry. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1280–1295, doi: 10.1360/SSC-2020-0110

四嗪反应后被脱除。随后本课题组^[6,7]报道了四嗪触发的赖氨酸脱笼反应用于蛋白质的原位化学激活, 自此开启了生物正交断键反应的开发与应用研究。

在本篇综述中, 我们从IEDDA反应机理出发, 从化学角度综述了该反应的优化与发展, 随后分别对IEDDA偶联反应和断键反应在生物学研究中的应用进行了梳理综述。最后对IEDDA反应进一步的发展与应用进行了讨论与展望。

2 IEDDA反应

2.1 反应机理

如图1所示, IEDDA反应的第一步是发生在双烯体1与亲双烯体之间的[4+2]环加成反应, 生成的具有高度环张力的桥环化合物2会迅速脱去一分子氮气, 生成4,5-二氢哒嗪衍生物3, 之后经过分子内质子转移互变异构形成1,4-二氢哒嗪衍生物异构体4, 最后经氧化生成哒嗪分子5^[8]。

在前线轨道理论层面, 正常电子需求的DA反应中, 电子转移是从双烯体的最高占据分子轨道(HOMO)流向亲双烯体的最低未占分子轨道(LUMO)。而在逆电子需求的IEDDA反应中, 电子流动方向恰好相反(图2)。也正是由于这一特殊的前线轨道作用机制, 可以通过在双烯体上连接吸电子基团降低双烯体的LUMO轨道能量, 抑或是在亲双烯体上连接给电子/富电子基团升高亲双烯体的HOMO轨道能量, 达到缩小小反应物HOMO、LUMO轨道之间的能量差, 从而使反应更容易进行。具体的电子效应以及空间效应等因素对反应的动力学影响在之后的章节中进一步讨论。

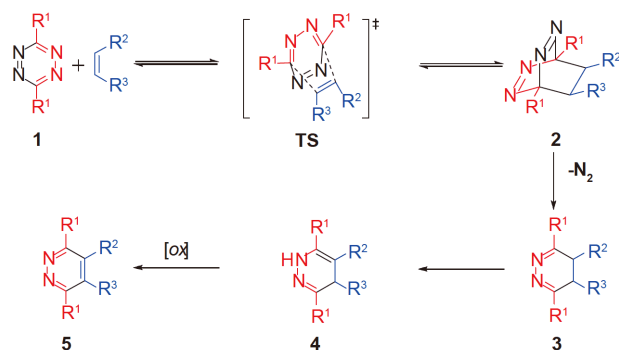


图1 IEDDA反应的示意图(网络版彩图)

Figure 1 Scheme of the IEDDA reaction (color online).

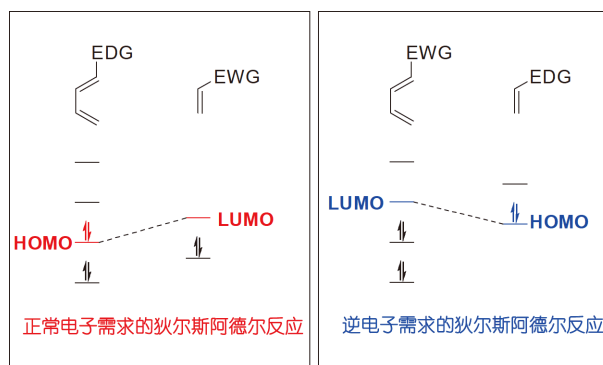


图2 正常电子需求DA反应与逆电子需求DA(IEDDA)反应的前线轨道示意图(网络版彩图)

Figure 2 Frontier molecular orbitals of normal electron demand Diels-Alder reaction and inverse electron demand Diels-Alder reaction (color online).

2.2 IEDDA反应底物的制备

2.2.1 双烯体(四嗪, Tz)的合成策略

四嗪衍生物最早被合成出来要追溯到1897年, Pinner利用亚氨酸酯同肼反应, 生成的二氢四嗪经过进一步的氧化生成得到1,2,4,5-四嗪(图3(a))^[9]。与该种方法类似, 使用腈类化合物同水合肼发生亲核加成反应, 再经由进一步的氧化同样可以得到四嗪化合物(图3(b))^[10]。而这一反应由于原料易得, 使得这一类以腈类化合物与水合肼为原料制备四嗪的反应在四嗪类衍生物的合成中被广泛使用^[11]。然而, 使用这两种方法得到的四嗪衍生物全部为3,6位对称取代的四嗪化合物, 因此, 开发出快速高产的不对称四嗪衍生物合成策略很快便成为了化学家们研究的重点。

2003年, Boger等^[12]以芳香亲核取代反应(S_NAr)为基础, 提出了针对不对称四嗪衍生物的合成策略(图3(c))。然而这一合成策略虽然成功地得到了不对称的四嗪衍生物产物, 但由于其涉及多步反应与纯化, 导致其应用上费时、费力, 很难做到大规模的高效合成。

2012年, Devaraj等^[13]通过金属催化的方法, 以三氟甲磺酸锌或三氟甲磺酸镍作为催化剂, 以肼和两种不同类型的腈为原料, 一锅法合成了四嗪衍生物(图3(d))。但该方法无法与多种活性官能团兼容, 因此, 化学家们开始尝试通过一些既得的四嗪分子中间体来合成更加复杂的不对称四嗪衍生物, 如利用Heck偶联、Liebeskind-Srogl偶联等反应, 在温和的条件下实现复杂不对称四嗪分子的合成(图3(e))^[14,15]。

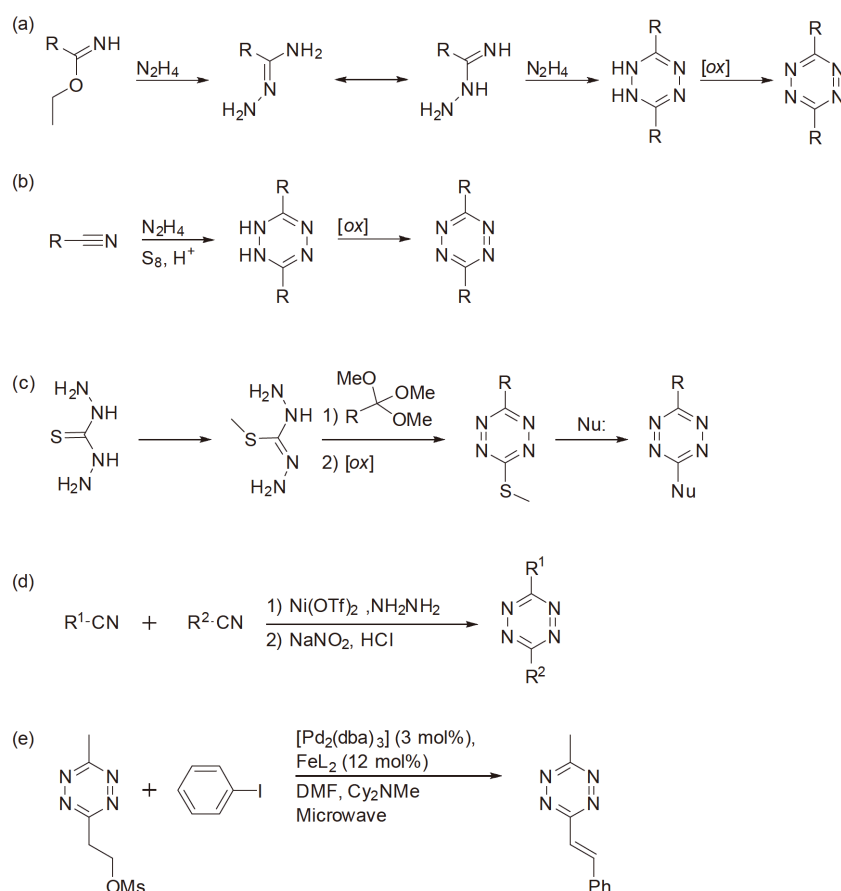


图3 四嗪衍生物的一般合成方法。(a) 亚氨酸酯-肼合成法^[9]; (b) 腈-水合肼合成法^[10]; (c) 芳香亲核取代法合成不对称四嗪衍生物^[12]; (d) 金属催化一锅法^[13]; (e) Heck偶联法^[15]

Figure 3 General synthesis routines of tetrazine derivatives. (a) Imidoesters-hydrazine synthetic strategy ^[9]; (b) nitrile-hydrazine hydrate synthetic strategy ^[10]; (c) synthesis of asymmetric tetrazine derivatives via aromatic nucleophilic substitution ^[12]; (d) one-pot synthesis of tetrazine derivatives by metal-catalysis ^[13]; (e) Heck ligation strategy ^[15].

2.2.2 亲双烯体的设计与合成

不同于四嗪被作为双烯体被广泛应用至IEDDA反应之中, 亲双烯体的选择相较而言会更多一些。在这里我们对最为常见的三类亲双烯体的一般合成策略进行了介绍, 他们分别是降冰片烯衍生物、反式环辛烯衍生物以及环丙烯衍生物。这三类亲双烯体各有优劣, 故而研究者可以根据具体需求选择不同的亲双烯体。

降冰片烯衍生物的合成方法最为简单, 由环戊二烯与连有吸电子基团的烯烃在路易斯酸(如氯化铝)的催化下发生狄尔斯-阿尔德反应生成(图4(a))^[12]。反式环辛烯衍生物的合成则涉及了烯烃构型上的控制, Fox等^[16]通过光化学产生反式和顺式环辛烯混合物, 利用硝酸银和二氧化硅的混合物不断富集反式环辛烯, 从而成功得到了构型单一的反式环辛烯衍生物产

物(图4(b))。对于环丙烯衍生物, 虽然这类IEDDA反应的反应速率较慢, 但环丙烯是体积最小的亲双烯体, 对生物分子本身的影响与干扰较小。而对于环丙烯衍生物的合成, 则可以在醋酸铈的催化下, 以重氮乙酸乙酯和1-三甲基甲硅烷基丙炔为原料, 通过[2+1]环加成反应获得。通过引入三甲基甲硅烷基取代基可以大大减小环丙烯的挥发性, 提升反应的可操作性, 而三甲基甲硅烷基也可以通过使用三丁基氟化铵的四氢呋喃溶液去除。最后, 由于酯同四嗪的反应活性有限, 在最后一步的合成中也被还原为醇的形式以提升其反应活性(图4(c))^[17]。

2.3 IEDDA反应的研究与优化

在这一章的讨论之中, 我们从应用最为广泛的反

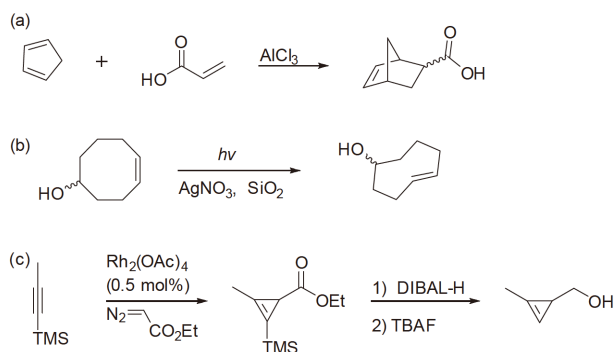


图 4 亲双烯体的一般合成方法. (a) 狄尔斯-阿尔德反应制备降冰片烯衍生物^[12]; (b) 光化学手段制备反式环辛烯^[16]; (c) 环丙烯衍生物的合成^[17]

Figure 4 General synthesis routines of dienophiles. (a) Preparation of norbornene derivatives via Diels-Alder reaction [12]; (b) preparation of TCO via photochemistry strategy [16]; (c) preparation of cyclopropene derivatives [17].

式环辛烯亲双烯体与四嗪两类反应底物出发, 分别综述其在偶联(图5(a))与断键(图5(b))IEDDA反应中的优化策略. 并且在这一部分的最后, 我们简要介绍了计算化学工作者对IEDDA反应优化的研究, 希望能从更多元化的角度对IEDDA反应优化策略进行了总结.

2.3.1 反式环辛烯的构效关系研究

作为IEDDA反应中应用最为广泛的亲双烯体, 反式环辛烯(transcyclooctene, TCO)的构效研究可以为研究者们对于亲双烯体的结构设计提供指导, 因此在这部分我们选取TCO为代表, 总结了可能降低IEDDA反应效率的诸多因素以及相应的解决方案.

在IEDDA偶联反应中, 最初研究者们对于亲双烯体的研究仅仅停留在修饰以给电子/富电子基团来提高HOMO轨道能量, 以此来提升IEDDA反应的速率. 然而在近些年来的研究中, 化学家们逐渐开始发现一些诸如环张力、取代基构象等因素同样对IEDDA反应的反应速率产生了重要的影响.

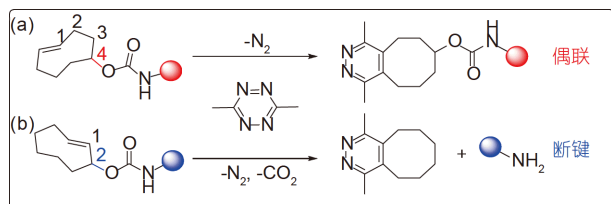


图 5 IEDDA偶联反应(a)与断键反应(b)(网络版彩图)

Figure 5 Scheme of IEDDA coupling (a) and cleavage (b) reactions (color online).

针对不同TCO衍生物的环张力对IEDDA反应速率的影响, Fox等^[8,18]先后设计并测量了一系列不同TCO衍生物的IEDDA反应速率^[19](图6(a)), 他们构建了一类具有更大环张力的双环TCO衍生物**6c**和**6d**. 由于额外的三元环所产生的张力, TCO八元环得以更高能量状态的“半椅式”构象存在, 相较于传统的单环TCO分子($19.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 大大提高了反应速率($3100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). 从本质上来讲, 这种方法是通过改变八元环的构象来实现反应效率的提升.

除了八元环自身的构象问题, TCO上取代基的构象同样会对IEDDA反应速率产生影响. Vrabel课题组^[20]首先对TCO上取代基的不同构象进行了机理层面的研究(图6(b)). 他们以TCO上不同构象的羟基取代基为研究对象, 经过对中间体**6f**的构象以及NMR数据分析, 当羟基处于直立构象时, 分子在过渡态时桥头碳上的氢原子与羟基氧原子的距离较近, 氧原子可以通过临近相互作用, 作为质子受体协助氢原子异构, 从而提高后一步的反应速率, 而计算化学模拟结果也同样证明了这一结论. 这一研究结果也让研究者们对亲双烯体的认识更加深入了一步: 除了通过在亲双烯体上连接给电子基团提高HOMO轨道的能级之外, 在构建亲双烯体时还应该进一步考虑取代基在立体化学方面的作用, 如构建直立构象的质子受体取代基对提高反应效率同样有着至关重要的作用.

在IEDDA断键反应中, 我们发现当取代基位于TCO的直立构象时的反应速率同样要远远大于取代基处于平伏构象时的情况^[6], 综合前面提到的Vrabel等的工作, 说明直立构象的取代基在断键反应中仍能够大大提高反应速率. 除此之外, 氨基甲酸酯结构作为IEDDA断键反应中最具代表性的断键连接臂(图5(b)), 其结构的设计同样具有值得关注的细节. Weissleder等^[21]对TCO分子及相应的断键连接臂进行了研究, 并且提出了对于氨基甲酸酯中氨基烷基化的重要性. 在实验中, 他们发现形成的双环中间体会发生分子内成环现象(图7), 而这一分子内环化副产物由于无法发生后续的消除反应, 大大降低了IEDDA断键反应的速度与产率. 为此, Weissleder等提出“氨基甲基化”策略, 以此来阻断分子内成环对反应的影响, 从而可大大提高反应效率, 消除分子内成环的副产物. 虽然对氨基进行甲基化可能会对之后释放的分子的活性产生一些影响, 但这一研究也为断键连接臂的设计提供了新的思路和注意事项, 对于开

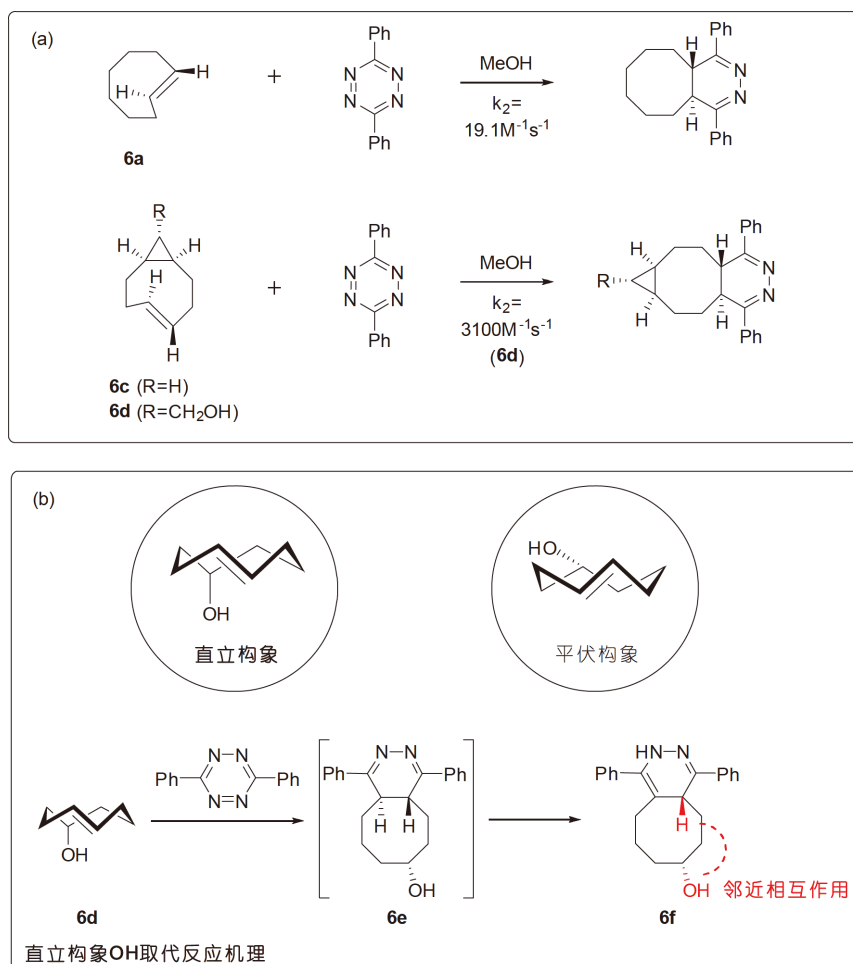


图6 TCO取代基构象对反应效率的影响研究. (a) TCO环张力对IEDDA反应速率的影响^[19]; (b) TCO上取代基构象对IEDDA反应速率的影响^[20](网络版彩图)

Figure 6 Conformations of substituent group influence reaction rates. (a) TCO ring strain influences reaction rates of IEDDA reactions [19]; (b) conformations of substituent groups on TCO influence IEDDA reaction rates [20] (color online).

发更高效的IEDDA反应对具有一定的启发性.

2.3.2 四嗪衍生物的构效关系研究

四嗪分子在大部分研究场景中都是作为外源性化学引发剂加入到反应体系之中, 因此四嗪分子的化学稳定性也是重要的影响因素. 虽然在前线轨道理论中, 四嗪分子上连接的吸电子基团可以有效地提高IEDDA反应的反应速率, 但是过强的吸电子取代基会加快四嗪分子在体内的降解速度^[22], 为了探究反应活性与分子稳定性的最佳平衡点, 他们设计了一系列具有不同取代基的四嗪衍生物(图8, 8a~8i), 实验结果表明连有给电子基团(8a)可以大大提高四嗪分子的稳定性(90%), 但相对应的反应速率则最低($210 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 在所

研究的9种四嗪衍生物中, 单取代的8e分子兼具可观的反应活性($4900 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)与生命体系稳定性(75%). 这一研究虽然涵盖的分子结构有限, 但其指出的给电子基团与吸电子基团对反应活性与稳定性的影响为研究者们提供了新的思路.

在IEDDA偶联反应中, 目前针对四嗪分子在IEDDA偶联反应上的优化研究大都停留在前线轨道层面^[23]. 由于作为双烯体的四嗪分子在同双烯体相互作用时是采用LUMO轨道同亲双烯体的HOMO轨道进行反应, 为此, 通过调节四嗪分子的LUMO能量, 从而缩小LUMO_{dienophile}-HOMO_{dienophile}的轨道能量差, 可以有效降低反应的活化能, 进而提高反应的反应速率. 又由于吸电子基团可以有效地降低四嗪分子的LUMO轨道能

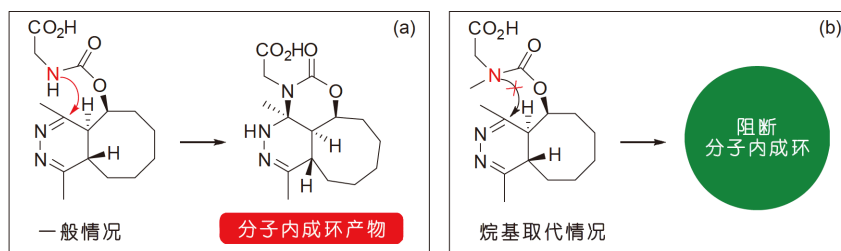


图 7 TCO的分子内成环(a)以及相应的阻断策略(b)(网络版彩图)

Figure 7 The intramolecular cyclization of TCO (a) and corresponding prevention strategy (b) (color online).

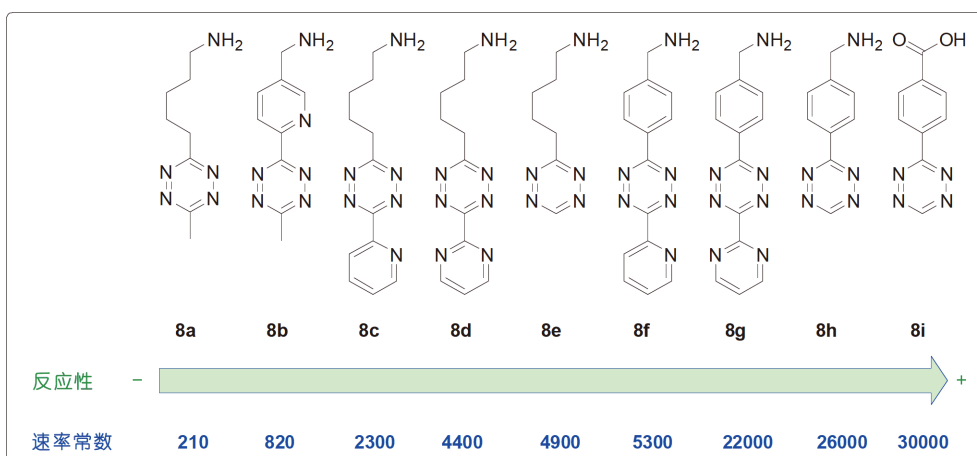


图 8 不同四嗪衍生物的反应活性与稳定性(网络版彩图)

Figure 8 Reactivity and stability of different tetrazine derivatives (color online).

量, 实现缩小LUMO-HOMO能量差的目的, 所以目前针对四嗪分子偶联优化的策略多是在四嗪分子的3,6位连接具有吸电子效应的取代基来提高反应效率。

在IEDDA断键反应中, 随着人们对四嗪参与的IEDDA反应研究的逐渐深入, 研究者们发现四嗪3位和6位连接基团的选择并非如之前提到的一样简单。针对四嗪结构的优化, 我们设计了一类非对称结构四嗪^[24]衍生物**9a**和**9b**, 通过在3位连接吸电子基团, 可以加速IEDDA反应第一步的环加成反应, 之后连接在6

位的非吸电子基团则可以促进后续的消除反应进行。通过两侧连接的不对称基团的协同作用, 他们成功地实现了活细胞内的快速生物正交反应, 其中**9a**在50 μM 的浓度下, 可以在4 min内于活细胞中达到超过90%的反应效率(图9)。

Weissleder等^[21]在深入研究四嗪介导的IEDDA反应机理之后, 提出了“局部酸催化理论”, 如图10所示。在图10所示的“局部酸催化”的过程中, 形成双环中间体之后, 连接在四嗪3位或6位的酸性基团会参与到下

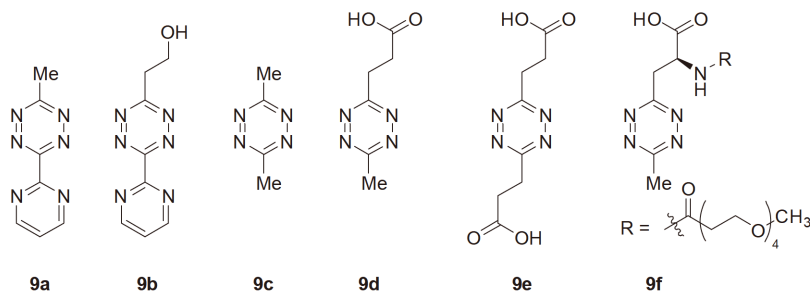


图 9 不同的四嗪衍生物的设计

Figure 9 Designs of different tetrazine derivatives.

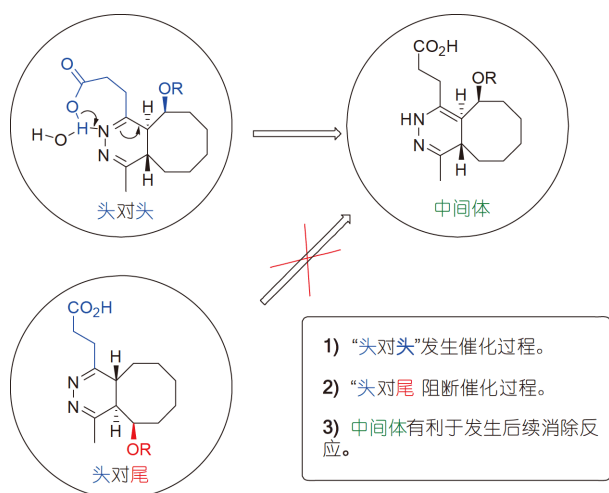


图 10 “局部酸催化”在四嗪介导的IEDDA反应中的示意图(网络版彩图)

Figure 10 Scheme of local acid catalysis in IEDDA reaction (color online).

一步的异构化反应之中, 生成动力学上利于发生后续消除反应的反应中间体。为了验证这一理论, 他们分别设计了图9中9c~9f 4个四嗪衍生物分子, 实验结果表明, 9c分子因为不含有酸性基团, 为4个分子中反应速率最低的分子, 9d分子由于只有50%的概率采取图10中“头对头”的局部酸催化模式, 另外50%的概率则会生成图10中的“头对尾”反应中间体, 所以“头对尾”分子的反应速率只有100%生成“头对头”中间体分子的1/2。除此之外, 4个分子的反应速率也和分子对应的 pK_a 相符合, 即酸性越强, 反应速率越快。

2.3.3 计算化学方法

随着对IEDDA反应研究的逐渐深入, 计算化学家们也展开了对IEDDA反应的研究。针对四嗪参与的IEDDA反应, Coelho等^[25]将密度泛函理论(DFT)与扭曲/相互作用模型相结合, 经过分析大量的IEDDA反应动力学数据, 成功地针对不同反应底物构建了数学模型。他们的研究表明, 相较于对双烯体(四嗪分子)进行结构上的修饰, 亲双烯体的结构对IEDDA反应的影响更为显著。而在化学家们最为关心的电子效应与立体化学因素中, 反应物的立体化学结构是决定IEDDA反应速率的最主要因素。因此, 为了提高IEDDA反应的速率, 最为有效的方式是增加双烯体与亲双烯体的环张力, 削弱碳碳键的强度, 可以大大降低反应的活化能, 提高反应速率。而这一实验结果也从另一个

层面阐释了为什么降冰烯、反式环辛烯、环丙烯等亲双烯体在IEDDA反应中展示优良的反应性能, 这几类分子在结构上均存在环内双键, 有效地削弱了反应活性部位的碳碳键强度, 大大降低了IEDDA反应所需的活化能。

不同于上述实验化学家们通过实验数据得到的经验性结论, Coelho等的实验结论以回归方程的形式向研究者们展示了各类描述子同反应速率的相关性以及量化关系, 也为实验化学家们后续的分子设计提供了理论依据和更多的可能。

3 IEDDA反应在生物学研究中的应用

在这一部分中, 我们先后从偶联反应和断键反应出发, 对IEDDA反应的生物学应用进行了总结, 包括标记成像、靶向运输、蛋白质功能调控与激活、药物动力学研究、核酸序列探针、前药的激活、siRNA的激活、RNA固相纯化等。

3.1 IEDDA偶联反应在生物学中的应用

3.1.1 生物成像

由于IEDDA反应底物的高度可修饰性, 研究者们可以通过化学合成方法在四嗪的3,6位修饰以发色基团抑或是具有定位效应的导向基团, 以此实现生物体的特定组分或是特定部位的成像(图11)。而通过IED-

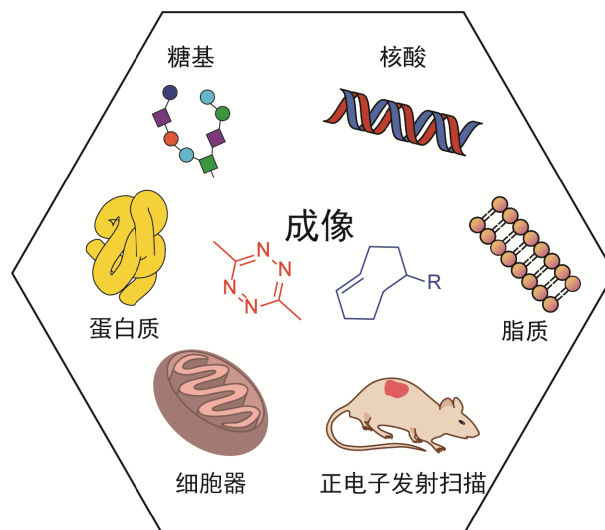


图 11 IEDDA反应在标记与成像中的应用(网络版彩图)

Figure 11 Applications of IEDDA reactions in labelling and imaging (color online).

DA偶联反应,不仅可以标记生命体中常见的蛋白质、脂质、糖、核酸等基础生物大分子,还可以实现线粒体、溶酶体、内质网等常见的细胞器成像,甚至可以作为正电子发射扫描(PET)探针用以活体成像。

(1) 蛋白质成像

在生物成像研究中最为广泛的便是蛋白质分子,蛋白质在生命体中无处不在,目前针对蛋白质的成像策略大体上有三种(图12)。第一种针对蛋白质的成像策略是通过抗原抗体相互作用来实现的,一般的做法是将亲双烯体偶联在抗体之上,同时将四嗪分子修饰以发色基团,借由IEDDA偶联反应以及抗原抗体相互作用实现细胞成像。例如, Hilderbrand等^[4]将降冰片烯衍生物偶联在曲妥单抗上,并在四嗪上修饰以近红外荧光基团,成功地实现了人类乳腺癌SKBR3细胞的成像。Devaraj等^[15]则通过原位合成一系列具有荧光基团的四嗪衍生物,并将TCO基团连接在A33抗体上,通过发生IEDDA偶联反应,消除了四嗪基团对于荧光的淬灭,最终完成了LS174T细胞的成像。

第二种蛋白质的成像策略则是通过构建非天然氨基酸^[26-28],将TCO分子或其他亲双烯体片段直接偶联至目标蛋白质的特定位点,之后再加入外源性的携带荧光基团的四嗪分子发生IEDDA偶联反应,实现特定蛋白质的荧光成像。Chin等^[27]通过基因编辑的方法,将降冰片烯插入到了大肠杆菌细胞以及哺乳动物细胞中,之后通过与连接荧光基团的四嗪小分子发生IEDDA偶联,成功地实现了蛋白质标记。

第三种蛋白质成像策略便是利用纳米材料或是量子点这类载体材料负载亲双烯体片段,利用载体的靶向作用实现特定蛋白质的成像。Weissleder等^[29,30]致力

于将IEDDA反应与材料领域中热门的纳米颗粒相结合,并成功将四嗪修饰的磁性荧光纳米粒子通过与TCO的IEDDA偶联反应连接到革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria)表面。除此之外,他们还将TCO修饰的抗体与四嗪修饰的磁性荧光纳米粒子联用,成功地实现了基于生物正交反应的、低信噪比的癌细胞检测与成像,该方法不但灵敏度高、检测速度快,还无需使用纯化的人体样本,在临床检测上具有巨大的应用潜力^[29]。同样是作为材料领域中明星的量子点也被应用到IEDDA偶联反应之中。Bawendi等^[31]尝试在量子点之上构建IEDDA反应体系,并成功地将染色团Alexa 594固定在量子点之上,之后通过构建表皮生长因子接收器(EGFR)过表达的A431细胞,经由“量子点-表皮生长因子-表皮生长因子接收器”作用,实现鳞状癌A431细胞成像。

(2) 脂质成像

脂质作为细胞中所有膜组分的基本组成,对于脂质的标记同样被研究者们所注意到。通过对脂质进行化学修饰,研究者们可以实现对细胞膜的成像以及对细胞信号转导的研究^[32-34]。Baskin等^[32]通过在脂质上修饰以TCO基团,通过TCO与连接了BODIPY发色基团的四嗪分子发生IEDDA反应(图13),实现了高时空分辨率的成像,成功地在亚细胞层面探明了磷脂酶D(PLD)的信号转导行为。

(3) 糖成像

糖分子作为细胞膜的组成成分之一,细胞膜表面的糖蛋白在细胞间信号传递过程中扮演着重要的角

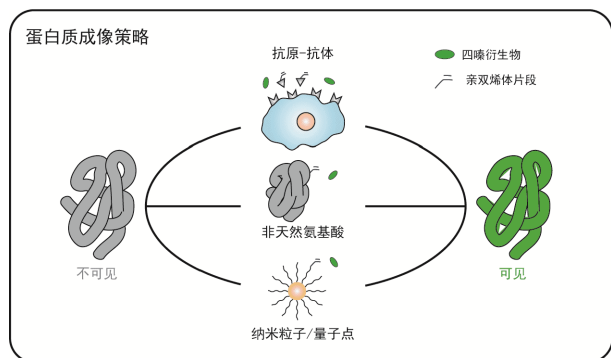


图12 IEDDA反应的蛋白质成像策略(网络版彩图)

Figure 12 Protein imaging strategies of IEDDA reaction (color online).

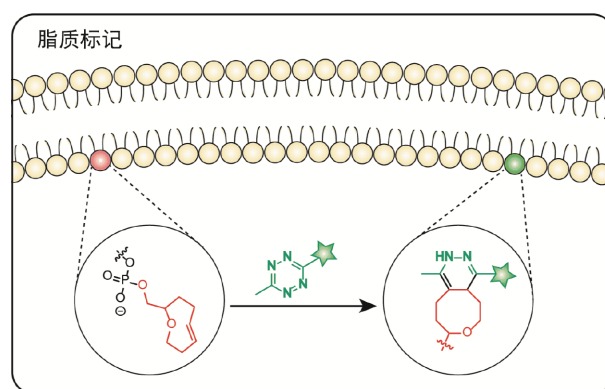


图13 IEDDA细胞膜成像用于研究细胞信号转导行为(网络版彩图)

Figure 13 Imaging of cell membrane for cell signal transduction study via IEDDA reaction (color online).

色, 因此将IEDDA偶联反应这一化学工具应用到糖分子之上很自然地成为了科学家们研究的问题之一^[35~38]。其中Wittmann等^[38]通过IEDDA反应实现了HEK 293T细胞的细胞膜成像。他们设计并合成了一系列具有不同支链长度烯烃修饰的甘露糖胺衍生物(图14), 在实现了细胞膜成像的同时还对不同支链长度的甘露糖胺的代谢行为进行了评估。

(4) 核酸成像

核酸分子作为生命体中的重要遗传物质, 在生命活动中有着不可替代的作用。而能够在不影响核酸生物功能的情况下, 实现对核酸分子的实时成像对生物学研究有着至关重要的意义^[39~41]。为了实现核酸标记, Devaraj等^[42]设计了一类连有荧光基团与四嗪的寡核苷酸衍生物, 由于荧光基团与四嗪距离较近, 未发生IEDDA反应之前, 荧光基团的荧光被四嗪所淬灭(图15)。而当核苷酸链的其他部位出现化学修饰的环丙烯基团时, 四嗪分子则与环丙烯发生IEDDA反应, 一方面远离了荧光基团, 另一方面失去芳香性, 导致淬灭作用消失, 荧光恢复, 从而实现了特定RNA或DNA序列的识别与成像。

(5) 细胞器成像

生物成像领域中另一热门课题便是亚细胞器成像, 由于通过对亚细胞器进行成像, 研究者们可以直观地观察到细胞中各类细胞器的微观形态, 并根据细胞器的不同形态初步判断细胞状态。为此, 研究者们根据不同细胞器的特点设计了一系列具有不同细胞器靶向的基团(如根据线粒体膜电位的差异设计带有正电

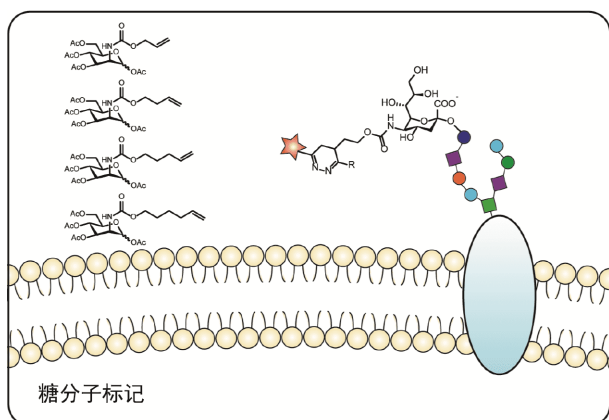


图14 IEDDA反应应用于代谢寡糖工程(网络版彩图)

Figure 14 Application of IEDDA on metabolic oligosaccharide engineering (color online).

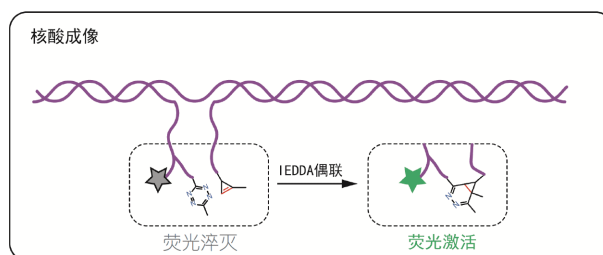


图15 IEDDA反应应用于核酸标记(网络版彩图)

Figure 15 IEDDA reaction applied in nucleic acid labelling (color online).

荷的三苯基膦基团实现线粒体靶向), 而这一工具通过与IEDDA反应联用, 便可以轻松实现亚细胞层面的成像^[43~45](图16)。例如, Park等^[45]则基于一系列的具有亚细胞定位效应的有机小分子, 设计了具有不同亚细胞定位的TCO-Tz探针。他们通过将TCO与具有线粒体靶向作用的三苯基膦片段相连接, 使TCO片段富集于细胞的线粒体, 之后通过添加荧光基团修饰的Tz小分子探针, 成功地实现了不同亚细胞器成像。

(6) 正电子发射扫描探针

正电子发射扫描(PET)作为一种具有高灵敏度的成像技术, 可以用来观测生物体的代谢过程以及追踪放射性同位素标记的生物大分子(图17)^[46]。其中¹⁸F作为目前应用最为广泛的放射性同位素, 被用来与IEDDA反应体系相结合, 构造用于PET成像的分子探针。Li等^[47,48]通过调节四嗪衍生物上的电子效应, 构建了低亲电性的二氢取代芳香核分子探针, 相对前一代探针具有更高的生物代谢稳定性和良好的成像效果。

3.1.2 药物的靶向运输

得益于IEDDA在诸多生物正交反应中具有最快

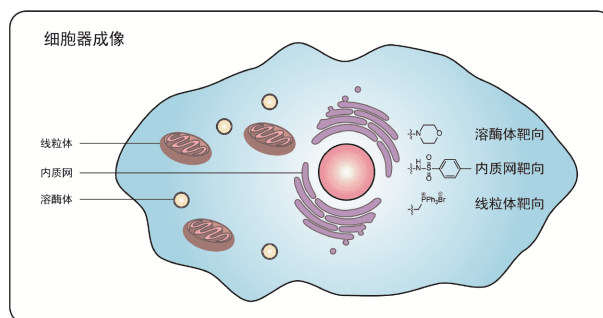


图16 IEDDA偶联反应应用于细胞器成像(网络版彩图)

Figure 16 Organelle imaging by IEDDA coupling reactions (color online).

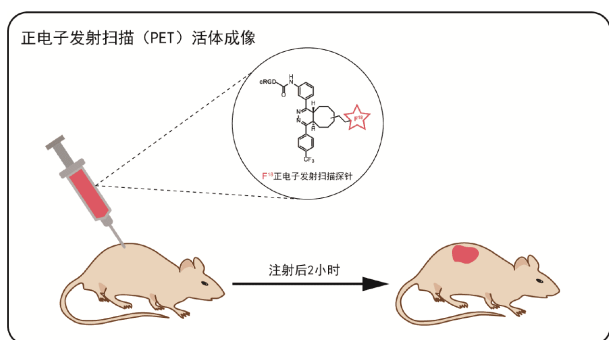


图 17 基于IEDDA反应构建的PET探针应用于活体成像(网络版彩图)

Figure 17 IEDDA-based PET probe for living imaging (color online).

的反应速率, IEDDA偶联反应被广泛应用于癌症的治疗之中^[49]. 一般的药物靶向运输思路与实现生物成像的思路类似, 研究者们可以将具有肿瘤杀伤效果的药物分子偶联在四嗪分子之上, 之后通过快速且专一的IEDDA偶联反应实现药物分子的靶向运输^[50](图18(a)). 除此之外, 还有一种思路是通过IEDDA偶联反应将包裹着药物分子的纳米载体偶联到可以识别肿瘤特异性抗原的抗体之上, 通过抗原抗体相互作用, 将药物载体(如高分子胶束等)运输至肿瘤部位, 之后再利用肿瘤微环境的差异(如pH等)降解药物载体, 从而实现药物的靶向运输释放^[51,52](图18(b)). 例如, Mikula等^[52]就构建了以羟丙甲丙烯酸甲酯(HPMA)为基底的高分子胶束载体, 通过在胶束表面修饰四嗪分子, 利用IED-

DA偶联将HPMA胶束成功地连接到了抗-TAG72单克隆抗体之上, 并且成功地将这一药物运输策略从生理缓冲溶液拓展到人体血清之中.

3.1.3 药物动力学研究

IEDDA偶联反应在药学上的应用远不止前面提到的那样简单, 除了作为药物与目标位点的导向剂, 研究者们还将这一IEDDA反应这一工具应用到了药物动力学研究之中^[53,54]. Weissleder等^[53]在研究中成功地构建了一种由可断裂连接臂连接四嗪分子的磁性微球. 研究人员将修饰了TCO的药物分子同活细胞共同孵育, 成功地利用构建好的四嗪磁性微球从细胞裂解液中抓取了与药物相互作用的蛋白质, 并在后续的处理中脱去磁性微球, 对目标表蛋白进行了分离以及质谱表征. 这一方法以IEDDA偶联反应为基础, 为发现新的药物作用靶点提供了全新的思路.

而在之后有关药物动力学研究的中, Bantscheff等^[54]则将上述方法中的磁性微球进行了多种替换, 通过连接亲和性响应器、成像响应器等不同的基团, 同时实现了单细胞水平的药物靶点确认、亚细胞定位、脱靶程度分析, 为药物的动力学研究提供了更多的信息与手段(图19).

3.1.4 蛋白质功能调控

除了荧光成像之外, Chin等^[55]应用非天然氨基酸插入技术以及IEDDA反应, 成功地选择性阻断了目标

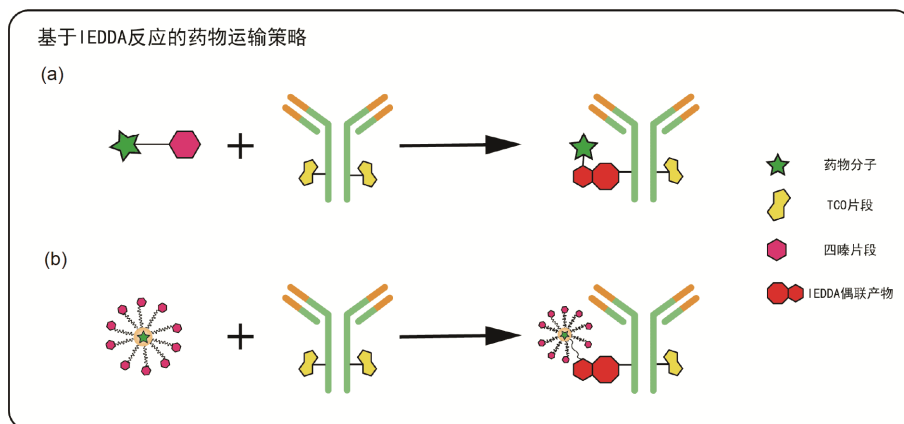


图 18 IEDDA应用于药物运输的不同策略. (a) 直接偶联实现药物靶向运输; (b) 纳米载体释放实现药物靶向运输(网络版彩图)

Figure 18 Different strategies of drug delivery via IEDDA reactions. (a) Drug delivery via direct ligation; (b) drug delivery via nano-carrier release (color online).

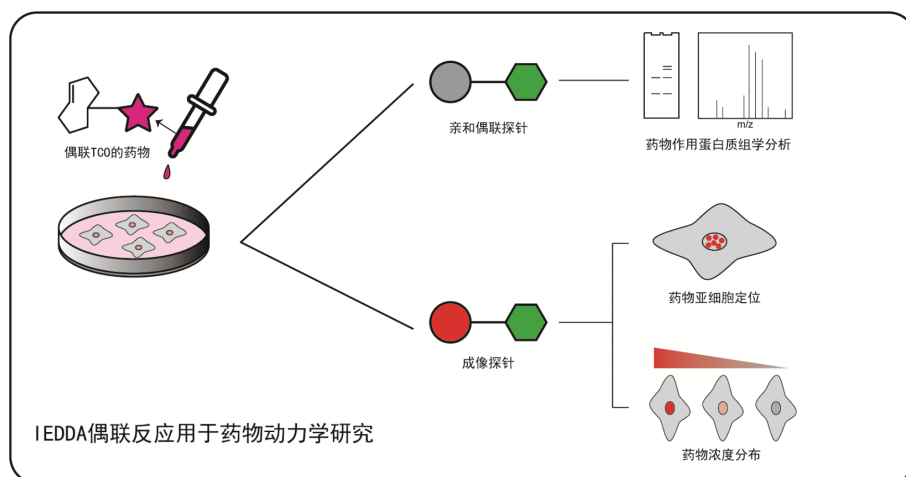


图 19 IEDDA偶联反应在药物动力学研究中的应用(网络版彩图)

Figure 19 Applications of IEDDA coupling in pharmacokinetics (color online).

蛋白质的生物功能. 为了实现蛋白质功能的阻断与恢复的可逆变化, 他们设计了一类可以插入到蛋白质特异位点的赖氨酸衍生物, 这一非天然氨基酸带有环丙烷环辛炔(BCN)基团, 可以作为IEDDA反应的亲双烯体. 同时作为双烯体的四嗪分子通过一段具有光异构性质的偶氮片段连接到阻断剂之上, 并将构筑的这一四嗪衍生物分子加入至之前编辑好BCN标签的蛋白质之中, 通过IEDDA偶联反应将二者连接到一起, 成功地实现了光调控的蛋白质功能阻断(图20). 在这项工作中, 研究者通过IEDDA反应将本身亲和性低、选择性低的阻断剂成功地靶向并阻断了MEK1蛋白^[56], 同时实现了可逆的特异性蛋白质功能调控.

3.2 IEDDA断键反应在生物学中的应用

随着化学家们对IEDDA偶联反应的研究愈加深入, 通过IEDDA断键反应(图5(b))在生物体系中实现生物分子的调控开始引起人们的关注^[7,57]. 所谓IEDDA断键反应, 目前应用最为广泛的便是以四嗪-反式环辛烯为基础而构建的IEDDA断键体系. 与IEDDA偶联反应不同的是, IEDDA断键反应可以使被保护基团(如TCO)修饰而失活的活性分子恢复活性, 而这一恢复过程, 则可以通过人为地加入化学小分子(Tz)来实现, 这一特性使得IEDDA断键反应在前药激活、蛋白质激活、siRNA激活、RNA固相纯化等领域得以广泛应用.

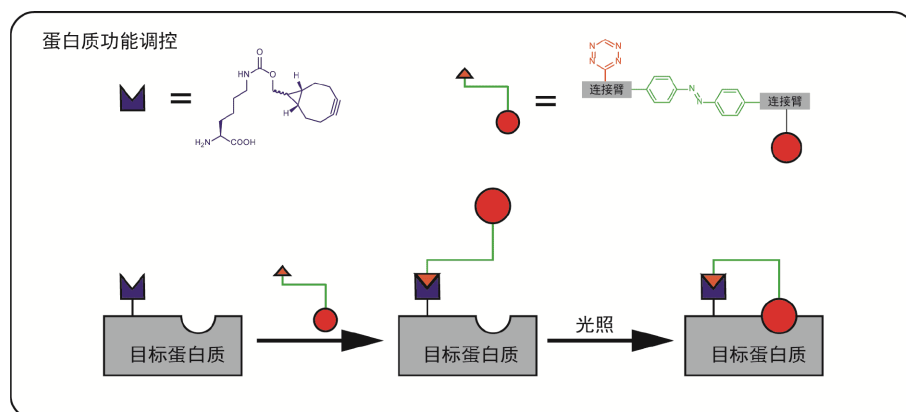


图 20 通过偶联非天然氨基酸实现蛋白质功能的调控(网络版彩图)

Figure 20 Incorporation of unnatural amino acid realizes protein manipulation (color online).

3.2.1 前药激活

早在2013年, Robillard等^[5]就第一次报道了通过快速IEDDA断键反应实现前药激活的研究(图21). 研究者通过氨基甲酸酯的形式将TCO基团连接到阿霉素之上制成前药, 随着人为加入四嗪分子作为引发剂, TCO与四嗪分子发生IEDDA反应生成二氢吡嗪衍生物, 又由于TCO的烯丙位经过氨基甲酸酯化, 该吡嗪衍生物可以进一步发生消除脱羧反应, 生成二氧化碳和阿霉素分子, 实现前药的激活(图21). 在此之后, 通过将TCO片段与阿霉素连接制成前药, 再由四嗪分子引发剂实现前药激活的研究络绎不绝^[58-60]. 其中Xie等^[60]通过将TCO修饰的阿霉素前药(Dox-TCO)包裹进具有肿瘤微环境响应的纳米载体, 该纳米载体可以识别肿

瘤微环境, 在肿瘤微环境中的高浓度氢离子刺激下释放包裹在其中的阿霉素前药, 之后和同样包裹在识别性纳米载体中的四嗪分子相互作用, 实现化学脱笼, 释放药物分子, 完成前药的激活, 用以肿瘤治疗.

3.2.2 蛋白质功能激活

IEDDA断键反应同样在蛋白质功能的调控领域中有巨大的应用前景^[6,61]. 2014年, 我们报道了通过基因编辑的方法, 将TCO修饰的赖氨酸衍生物插入到萤火虫荧光素酶之中^[6]. 在该蛋白质中, 赖氨酸位点作为将荧光素由无光状态转化为高强度荧光状态的关键位点(图22), 被TCO修饰时荧光素无法被激活, 而当人为加入四嗪引发剂后, 赖氨酸位点的TCO发生IEDDA

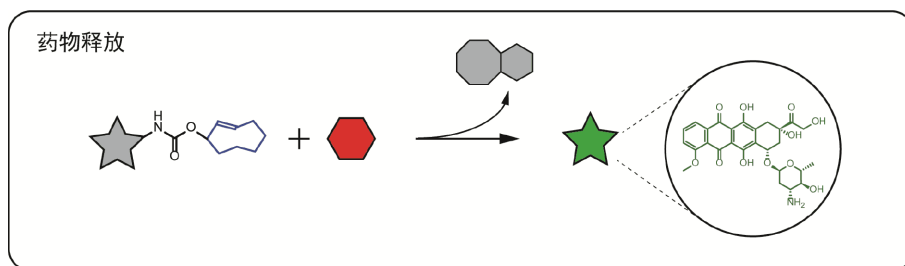


图 21 IEDDA断键反应激活阿霉素前药(网络版彩图)

Figure 21 Activation of doxorubicin prodrug via IEDDA cleavage reaction (color online).

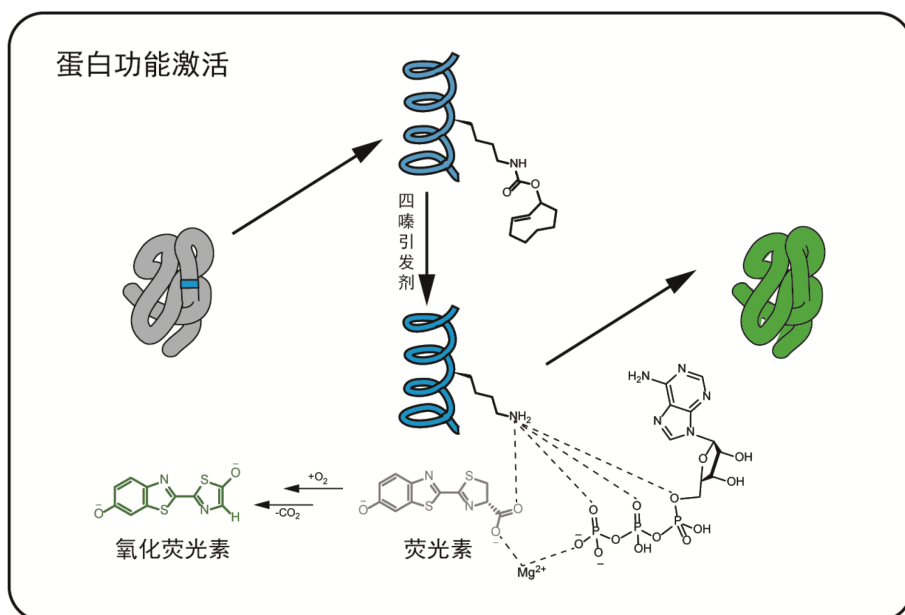


图 22 IEDDA断键反应在蛋白质功能激活恢复的应用(网络版彩图)

Figure 22 Applications on protein activation via IEDDA cleavage reactions (color online).

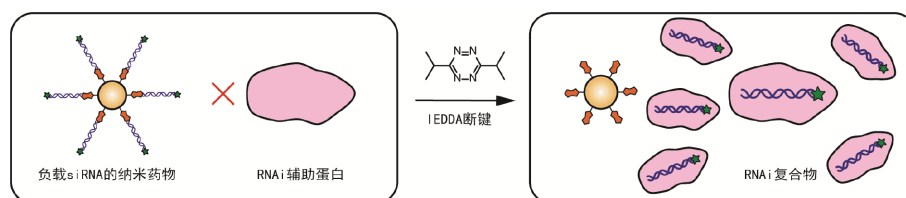


图 23 IEDDA断键反应在siRNA纳米药物释放中的应用(网络版彩图)

Figure 23 Applications on siRNA nanodrugs releasing via IEDDA cleavage reaction (color online).

断键反应, 荧光素酶的功能被激活, 致使荧光素发光. 此类通过IEDDA断键反应实现蛋白质功能激活恢复的策略目前已被广泛应用于细胞与动物的研究中^[61].

3.2.3 siRNA激活

除了对蛋白质的功能进行调控, IEDDA断键反应同样适用于核酸这一类生物大分子. 小分子干扰核糖核酸(siRNA), 又被称作静默RNA, 是一类具有双链结构的非编码RNA, 他最开始被科研人员发现是作为植物中的转录后基因沉默现象^[62]. siRNA一般由20~25个碱基对构成, 在核糖核酸干扰(RNAi)的通路中起着重要作用, 因而siRNA的时空激发便成为了RNAi疗法的关键^[63]. 目前报道的siRNA运输大多是依赖于细胞间或细胞内外的环境因子差异, 如还原电势、ATP浓度、pH等因子, 然而当面对内源环境十分复杂的情况时, 却很难做到时间分辨率上的siRNA激活. Royzen等^[64]合成了一类siRNA纳米药物(图23), 通过加入外源性的四嗪分子引发剂发生IEDDA断键反应, 使得siRNA分子在特定部位释放并结合RNAi辅助蛋白生成RNAi复合物, 从而实现了时间分辨率上的siRNA激活.

3.2.4 RNA的固相纯化

上述关于IEDDA断键反应的应用大都是在生物功能上的研究, 而IEDDA反应在合成生物学研究中同样有着巨大的研究潜力. Royzen等^[65]就将IEDDA断键反应应用到了RNA的固相合成与纯化之中(图24). 在该项研究中, 研究者以一个3 nt长度的低聚发夹RNA链为研究模型, 通过在RNA链尾端连接一个可以被IEDDA反应切割发生断键的TCO基团, 将固相合成的RNA混合物通过连有四嗪基团的琼脂糖小球, 经由IEDDA断键反应, 完整的RNA链可以通过琼脂糖小球缓慢流出, 避免了常规的HPLC纯化过程, 大大简化了RNA固相合成中的纯化步骤. 但此方法由于需要对

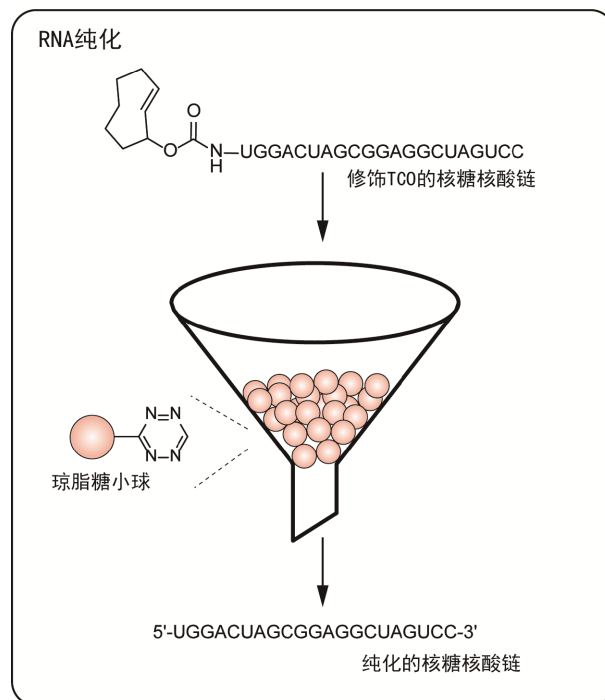


图 24 IEDDA断键反应在RNA固相合成与纯化上的应用(网络版彩图)

Figure 24 IEDDA cleavage reaction applied on solid phase RNA synthesis and purification (color online).

RNA的末端进行化学修饰, 故在应用的广谱性上仍然存在一定限制. 为了改善这一问题, 之后的研究可能需要在连接片段的设计上进行一定改善.

4 总结与展望

研究者已对IEDDA反应的机理、动力学过程、反应前驱体的设计以及反应效率的优化等方面进行了较为深入的研究. 随着IEDDA反应的开发与发展, 其在生物体系中的应用潜力也逐渐显现出来. 通过IEDDA反应, 研究者既可以对诸如蛋白质、核酸、糖、脂质等生

物大分子进行成像, 又可以对亚细胞器、细胞、组织以及生物体等不同层面的生物结构进行观测. 不仅如此, 辅以一些其他的化学手段(如添加光致异构片段、修饰化学断键连接臂、偶联具有定位效应的基团等), IEDDA反应还可以对生命的微观过程进行精确的调控, 如对特定蛋白质酶的激活、药物的靶向释放等.

随着应用场景由试管到体外, 再到活细胞、组织以及活体动物的不断升级, 生物正交反应的标准和要求也越来越高. 因此IEDDA反应也面临着优化升级的需求, 更加快速、高效的偶联以及断键反应的设计开发将进一步推动生物正交反应用于更为复杂的生命体系中, 同时从降低药物剂量的角度进一步展示这类反

应的实际应用的巨大潜力.

生物正交反应提供了在生物体系中精准标记或者调控目标分子的化学方法. 而生物体系复杂多变、生物分子多种多样, 因此IEDDA偶联和断键反应在生物体系中更为广泛的应用值得期待. 以蛋白质的化学调控为例, IEDDA断键反应已在“赖氨酸脱笼”方面得到了充分展示. 然而, 除赖氨酸外还有19种天然氨基酸, 其中不乏常见的位于蛋白质活性位点的关键氨基酸(如酪氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸等具有活性侧链官能团的氨基酸), 将IEDDA断键反应拓展到其他氨基酸的脱笼, 组建氨基酸“脱笼工具箱”, 将是蛋白质在体原位调控的重要化学工具.

参考文献

- Diels O, Kech H. *Justus Liebigs Ann Chem*, 1927, 519: 140–146
- Carboni RA, Lindsey RV Jr. *J Am Chem Soc*, 1959, 81: 4342–4346
- Blackman ML, Royzen M, Fox JM. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 13518–13519
- Devaraj NK, Weissleder R, Hilderbrand SA. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 2297–2299
- Versteegen RM, Rossin R, ten Hoeve W, Janssen HM, Robillard MS. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 14112–14116
- Li J, Jia S, Chen PR. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 1003–1005
- Li J, Chen PR. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 129–137
- Taylor MT, Blackman ML, Dmitrenko O, Fox JM. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 9646–9649
- Selvaraj R, Fox JM. *Tetrahedron Lett*, 2014, 55: 4795–4797
- Curtius T, Hess A. *J Prakt Chem*, 1930, 125: 40–53
- Audebert P, Sadki S, Miomandre F, Clavier G, Claude Vernières M, Saoud M, Hapiot P. *New J Chem*, 2004, 28: 387–392
- Soenen DR, Zimbleman JM, Boger DL. *J Org Chem*, 2003, 68: 3593–3598
- Yang J, Karver MR, Li W, Sahu S, Devaraj NK. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 5222–5225
- Lambert WD, Fang Y, Mahapatra S, Huang Z, am Ende CW, Fox JM. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 17068–17074
- Wu H, Yang J, Šečutě J, Devaraj NK. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 5805–5809
- Royzen M, Yap G, Fox J. *Chemtracts*, 2008, 21: 46–48
- Patterson DM, Nazarova LA, Xie B, Kamber DN, Prescher JA. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18638–18643
- Selvaraj R, Fox JM. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 753–760
- Bach RD. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5233–5243
- Vázquez A, Dzajak R, Dračinský M, Rampmaier R, Siegl SJ, Vrabel M. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1334–1337
- Carlson JCT, Mikula H, Weissleder R. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 3603–3612
- Karver MR, Weissleder R, Hilderbrand SA. *Bioconj Chem*, 2011, 22: 2263–2270
- Qin LH, Hu W, Long YQ. *Tetrahedron Lett*, 2018, 59: 2214–2228
- Fan X, Ge Y, Lin F, Yang Y, Zhang G, Ngai WSC, Lin Z, Zheng S, Wang J, Zhao J, Li J, Chen PR. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 14046–14050
- Ravasco JM, Coelho JAS. *J Am Chem Soc*, 2020, doi: 10.1021/jacs.9b11948
- Liu DS, Tangpeerachaikul A, Selvaraj R, Taylor MT, Fox JM, Ting AY. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 792–795
- Lang K, Davis L, Torres-Kolbus J, Chou C, Deiters A, Chin JW. *Nat Chem*, 2012, 4: 298–304
- Kozma E, Nikić I, Varga BR, Aramburu IV, Kang JH, Fackler OT, Lemke EA, Kele P. *ChemBioChem*, 2016, 17: 1483
- Peterson VM, Castro CM, Lee H, Weissleder R. *ACS Nano*, 2012, 6: 3506–3513

- 30 Chung HJ, Reiner T, Budin G, Min C, Liong M, Issadore D, Lee H, Weissleder R. *ACS Nano*, 2011, 5: 8834–8841
- 31 Han HS, Devaraj NK, Lee J, Hilderbrand SA, Weissleder R, Bawendi MG. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7838–7839
- 32 Liang D, Wu K, Tei R, Bumpus TW, Ye J, Baskin JM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 15453–15462
- 33 Gaikwad H, Wang G, Smith WJ, Alexander KL, D'Alessandro A, Zhang W, Purev E, Simberg D. *Bioconj Chem*, 2019, 30: 2106–2114
- 34 Fritz T, Voigt M, Worm M, Negwer I, Müller SS, Kettenbach K, Ross TL, Roesch F, Koynov K, Frey H, Helm M. *Chem Eur J*, 2016, 22: 11578–11582
- 35 Niederwieser A, Späte AK, Nguyen LD, Jüngst C, Reutter W, Wittmann V. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 4265–4268
- 36 Späte AK, Scharf VF, Häfner J, Niederwieser A, Mayer TU, Wittmann V. *Beilstein J Org Chem*, 2014, 10: 2235–2242
- 37 Späte AK, Scharf VF, Schöllkopf S, Niederwieser A, Wittmann V. *Chem Eur J*, 2014, 20: 16502–16508
- 38 Späte AK, Bußkamp H, Niederwieser A, Scharf VF, Marx A, Wittmann V. *Bioconj Chem*, 2014, 25: 147–154
- 39 Ganz D, Harijan D, Wagenknecht HA. *RSC Chem Biol*, 2020, 1: 86–97
- 40 Merkel M, Peewasan K, Arndt S, Ploschik D, Wagenknecht HA. *ChemBioChem*, 2015, 16: 1541–1553
- 41 Rieder U, Luedtke NW. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 9168–9172
- 42 Šečutė J, Yang J, Devaraj NK. *Nucl Acids Res*, 2013, 41: e148
- 43 Siegl SJ, Galeta J, Dzajak R, Vázquez A, Del Río-Villanueva M, Dračinský M, Vrabel M. *ChemBioChem*, 2019, 20: 886–890
- 44 Loredó A, Tang J, Wang L, Wu KL, Peng Z, Xiao H. *Chem Sci*, 2020, 11: 4410–4415
- 45 Kim D, Lee JH, Koo JY, Kim HM, Park SB. *Bioconj Chem*, 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00197
- 46 Phelps ME. *Annu Rev Nucl Part Sci*, 2002, 52: 303–338
- 47 Selvaraj R, Liu S, Hassink M, Huang C, Yap L, Park R, Fox JM, Li Z, Conti PS. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 5011–5014
- 48 Selvaraj R, Giglio B, Liu S, Wang H, Wang M, Yuan H, Chintala SR, Yap LP, Conti PS, Fox JM, Li Z. *Bioconj Chem*, 2015, 26: 435–442
- 49 Takayama Y, Kusamori K, Nishikawa M. *Molecules*, 2019, 24: 172
- 50 Marques-Gallego P, De Kroon AIPM. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 1–12
- 51 Oehrl A, Schötz S, Haag R. *Colloid Polym Sci*, 2020, 298: 719–733
- 52 Kramer S, Svatoněk D, Alberg I, Gräfen B, Schmitt S, Braun L, van Onzen AHAM, Rossin R, Koynov K, Mikula H, Zentel R. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 3786–3797
- 53 Yang KS, Budin G, Tassa C, Kister O, Weissleder R. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 10593–10597
- 54 Rutkowska A, Thomson DW, Vappiani J, Werner T, Mueller KM, Dittus L, Krause J, Muelbaier M, Bergamini G, Bantscheff M. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 2541–2550
- 55 Tsai YH, Essig S, James JR, Lang K, Chin JW. *Nat Chem*, 2015, 7: 554–561
- 56 Brott BK, Alessandrini A, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Crews CM, Erikson RL. *Cell Growth Differ*, 1993, 4: 921–929
- 57 Krall N, da Cruz FP, Boutureira O, Bernardes GJL. *Nat Chem*, 2016, 8: 103–113
- 58 Khan I, Agriş PF, Yigit MV, Royzen M. *Chem Commun*, 2016, 52: 6174–6177
- 59 Xu M, Tu J, Franzini RM. *Chem Commun*, 2017, 53: 6271–6274
- 60 Zuo L, Ding J, Li C, Lin F, Chen PR, Wang P, Lu G, Zhang J, Huang LL, Xie HY. *Chem Sci*, 2020, 11: 2155–2160
- 61 Zhang G, Li J, Xie R, Fan X, Liu Y, Zheng S, Ge Y, Chen PR. *ACS Cent Sci*, 2016, 2: 325–331
- 62 Hamilton AJ. *Science*, 1999, 286: 950–952
- 63 Carthew RW, Sontheimer EJ. *Cell*, 2009, 136: 642–655
- 64 Khan I, Seebald LM, Robertson NM, Yigit MV, Royzen M. *Chem Sci*, 2017, 8: 5705–5712
- 65 Agustín E, Asare Okai PN, Khan I, Miller MR, Wang R, Sheng J, Royzen M. *Chem Commun*, 2016, 52: 1405–1408

Development and applications of inverse-electron-demand Diels-Alder reaction in bioorthogonal chemistry

Xianrui Zhang¹, Huixin Luo¹, Xinyuan Fan^{1,2,*}, Peng R. Chen^{1,2*}

¹ College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

² Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Beijing 100871, China

*Corresponding authors (email: xinyuanfan@pku.edu.cn; pengchen@pku.edu.cn)

Abstract: Inverse-electron-demand Diels-Alder (IEDDA) reaction has become the most attractive bioorthogonal reaction due to its advantages of good biocompatibility, high reaction specificity and fast reaction kinetics. Therefore, extensive studies have been conducted in terms of reaction mechanism, reactants synthesis, chemistry optimization, biological applications, *etc.*, for IEDDA ligation and cleavage reactions respectively. In this review, first of all, we introduce the development and optimizations of the IEDDA reaction, followed by its biological applications including biomolecules labeling, protein manipulation, activation, drug delivery, pharmacokinetics study, prodrug releasing, siRNA activation and solid phase RNA purification. At last, we envision that further studies and applications of the IEDDA reaction are in demand, and expect that by exploring more optimized reaction pairs and wider biological applications, the research area of bioorthogonal chemistry would rush into a new era.

Keywords: inverse-electron-demand Diels-Alder reaction, bioorthogonal chemistry, bioorthogonal bond cleavage reaction, biomolecule labelling, protein activation

doi: [10.1360/SSC-2020-0110](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0110)