

PROTECCIÓN ANTE TUMORES GRACIAS A LA QUÍMICA BIOORTOGONAL.

Claudia Aranda Bonaño, María de las Mercedes Gata Vázquez, Cristian Picón Andrés.

Resumen.

Una de las enfermedades que más preocupa a nivel mundial y que constituyendo una de las principales causas de muerte es el cáncer. La química puede jugar un papel importante en la búsqueda de nuevos tratamientos y terapias para esta y muchas otras enfermedades. Una de estas nuevas líneas de investigación es la química bioortogonal, cuya importancia ha quedado demostrada recibiendo el Premio Nobel de Química de este año 2022.

Palabras Claves.

Célula, química bioortogonal, química click, sustrato.

1. INTRODUCCIÓN

La química bioortogonal consiste en una reacción química que puede ocurrir dentro de los sistemas vivos sin interferir con los procesos bioquímicos nativos. Las reacciones bioortogonales son transformaciones intrínsecamente selectivas. Este concepto ha permitido estudiar biomoléculas como glicanos, proteínas y lípidos en tiempo real en sistemas vivos sin producir toxicidad celular. [1]

Este proceso tiene lugar en dos pasos:

- 1.- En primer lugar, un sustrato celular se modifica con un grupo funcional bioortogonal, que se introduce en la célula. Estos sustratos incluyen metabolitos, inhibidores de la enzima, etc.
- 2.- En segundo lugar, se introduce una sonda para reaccionar y etiquetar el sustrato.

La química bioortogonal se ha convertido en una herramienta esencial para los campos de la imagen biomédica, química medicinal, síntesis de proteínas, ciencia de polímeros, ciencia de materiales y ciencia de superficies. [2] Sus aplicaciones son diversas e incluyen desde la expansión del código genético hasta la ingeniería metabólica. Son técnicas que se pueden utilizar para tratar varios tumores ya que pueden matar las células cancerosas sin perturbar las células sanas.

2. ¿CÓMO FUNCIONA LA QUÍMICA CLIC Y LA QUÍMICA BIOORTOGONAL?

2.1. Concepto de "click chemistry"

El concepto de "click chemistry" describe reacciones de formación de compuestos orgánicos complejos a través del ensamblaje de otros más sencillos mediante la formación de nuevos enlaces, similares a los que llevan a cabo los organismos vivos.

Una reacción clic debe ser de amplio alcance, con grados de conversión y selectividad muy elevados, generando el mínimo número de subproductos, y si se dan, se deben poder separar fácilmente. [3] Las condiciones de reacción deben ser sostenibles (en agua preferentemente).

Hay muchos ejemplos de reacciones clic. La más conocida, es la reacción de cicloadición entre una azida y un alquino terminal, catalizada por Cu (I), que da lugar a la formación de triazoles cíclicos. Esta reacción fue reportada simultáneamente por Sharpless y Medal a principios de siglo (2001-2002). [3] La aplicación de esta reacción de cicloadición directamente en células humanas define el concepto de *Química Bioortogonal*.

2.2. Química bioortogonal

El objetivo de la Química BIOORTOGONAL, es usar una sonda, esto es, un motivo químico único y pequeño como por ejemplo un sencillo grupo funcional, que se incorpora a la biomolécula objeto de investigación usando la propia maquinaria biosintética celular. Tras ello se suministra exógenamente un marcador específico químico que se une covalentemente a la sonda. Esto representa un pequeño tamaño respecto a la molécula original, por lo que no se modifica sensiblemente su estructura ni su funcionalidad, pero la hace "visible". Por ejemplo, se ha comprobado que, para construir proteínas, la maquinaria biosintética celular no es capaz de distinguir a los aminoácidos dotados de sondas bioortogonales de los aminoácidos naturales carentes de las sondas. Entre las pequeñas sondas que hasta ahora se han usado, en bastantes casos con éxito, se encuentran algunas muy prometedoras como azidas o alquinos terminales entre otras.

Estas nuevas aplicaciones de la Química bioortogonal se han realizado no sólo sobre bastantes ejemplos de proteínas sino también de otras moléculas como hidratos de carbono y lípidos. Todo permite suponer que se trata de una nueva forma de poder "visualizar" múltiples clases de biomoléculas en los sistemas vivos, incluso en los organismos complejos, permitiendo seguir sus transformaciones a lo largo de los procesos metabólicos. [4]

3. “CLICK CHEMISTRY” LIBRE DE COBRE: EJEMPLOS DE CICLOADICIÓN ENTRE AZIDAS Y ALQUINOS PROMOVIDA POR CICLOS TENSIONADOS.

La cicloadición catalizada por Cu(I) se desarrolla más rápido que la cicloadición sin catalizar, y ha tenido gran impacto en la síntesis química de fármacos y otros materiales. Sin embargo, su aplicación en sistemas biológicos se ha visto limitada por la citotoxicidad del Cu(I). [5] Por ello, se ha desarrollado la misma reacción, pero libre de este metal.

Para ello, Bertozzi y colaboradores exploraron la cicloadición entre un grupo funcional azida y un derivado ciclooctino biotinizado. Utilizando como etiqueta bioortogonal el grupo azida (incorporado metabólicamente) se comprobó la modificación covalente en la superficie celular del cultivo, sin observar efectos citotóxicos aparentes.

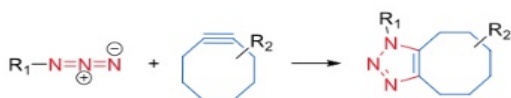


Figura 1. Reacción de cicloadición entre una azida y un ciclooctino.

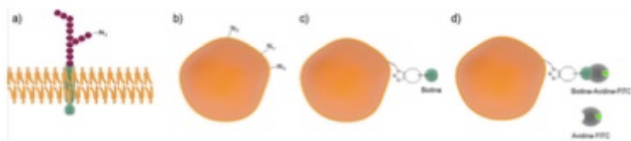


Figura 2. Reacción bioortogonal en la superficie celular entre azidas y ciclooctino. a) y b) Incorporación de grupos funcionales azida a través de la biosíntesis del ácido siálico de las glicoproteínas de superficie de membrana. c) Reacción bioortogonal entre azida y un derivado ciclooctino biotinizado. d) Adición de sonda fluorescente (avidina-FTIC)

Una aplicación reciente de las cicloadiciones entre azidas y alquinos, consiste en la incorporación de azido-azúcares en las glicoproteínas de células tumorales provenientes del cultivo de cortes de tumor de próstata. Este trabajo, ha permitido imágenes de microscopía de las glicoproteínas de membrana a nivel de células tumorales, por reacción del ciclooctino DIBAC conjugado a un fluoróforo.

A su vez permitió la separación e identificación de nuevos biomarcadores tumorales, a través de la funcionalización de las azidas con un alquino biotinilado, que reacciona a través de “click chemistry” y posteriormente es capturado en esferas funcionalizadas con avidina.

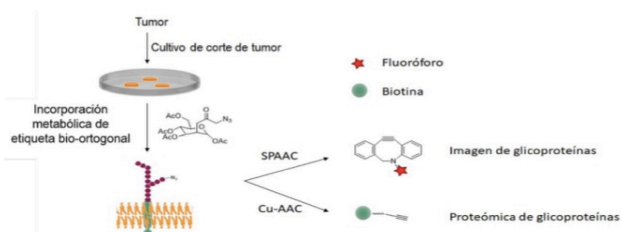


Figura 3. Plataforma bioortogonal enfocada a la caracterización tumoral a nivel clínico.

4. CICLOADICIÓN ENTRE TETRAZINAS CICLOOCTENO. QUÍMICA BIORTOGONAL IN VIVO.

Mediante esta técnica, se ha desarrollado un método predecible para reacciones de clic *in vivo* eficientes. En concreto, se ha demostrado que las tetrazinas modificadas con polímeros (PMT) son clave para la química bioortogonal *in vivo* basada en la reacción [4+2] tetrazina/cicloocteno trans. Usando PMT fluorescente para la resolución celular y ¹⁸F para la producción de imágenes, se demostró que los epítomos de la célula cancerosa pueden reaccionar fácilmente *in vivo*. Esta reacción de cicloadición entre tetrazina (Tz) y trans-cicloocteno (TCO) puede proceder de manera más rápida que las reacciones de azida y alquino clic previamente estudiadas y, lo que es más importante, no requiere la acción de un catalizador.

Esta reacción también ha sido adaptada para la obtención de imágenes de células utilizando nuevas sondas fluorogénicas Tz. Como blanco, se usan epítomos de células cancerosas en las que se muestran especificidad y sensibilidad del método en un modelo de ratón con cáncer de colon. Específicamente, se observó el etiquetado *in vivo* con resolución celular utilizando fluoróforos infrarrojos cercanos. Además, se demuestra el uso de reacciones bioortogonales con isótopos de tomografía de emisión de positrones (PET) de rápida desintegración para obtener imágenes de epítomos de células cancerosas en tumores sólidos.

4.1 Procedimiento experimental.

Inicialmente, se hicieron reaccionar agentes fluorescentes infrarrojos cercanos de la proyección de imagen de PMT para obtener la resolución celular de la reacción bioortogonal *in vivo*. [5] Los agentes fluorescentes evitan las complejidades de coste y manejo de los radionucleidos, y cada vez se utilizan más para aplicaciones *in vivo*. [6]

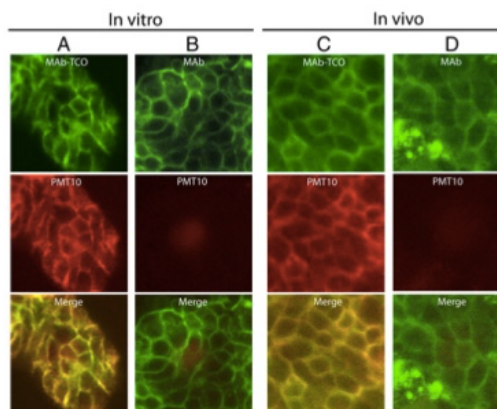


Figura 4. Microscopía *in vitro* e *in vivo* de PMT10 fluorescente dirigida a un epítomo de células cancerosas. Proyección de imagen confocal que demuestra el acercamiento de PMT10 a los anticuerpos trans-ciclooctano (TCO) en la superficie de las células de LS174T tanto *in vitro* como *in vivo*. (A) Células LS174T en cultivo etiquetadas con anticuerpos monoclonales TCO seguidas por el etiquetado PMT10. (B) Igual que antes excepto los anticuerpos monoclonales carecen de TCO. (C) Células en un xenoinjerto LS174T *in vivo* etiquetadas con anticuerpos monoclonales TCO seguidas de etiquetado PMT10 (750 nm). (D) Lo mismo que antes, excepto los anticuerpos monoclonales carecen de TCO.

De esta forma se demuestra que las reacciones bioortogonales de TCO/Tz pueden ocurrir de manera eficiente en animales vivos cuando se optimiza la farmacocinética de la reacción. Estas condiciones se encuentran comúnmente al etiquetar moléculas expuestas a la superficie y es directamente comparable

a los experimentos dirigidos a los antígenos de la superficie celular en la sangre.

Para otras dianas, como tumores sólidos, el perfil de concentración de los agentes primarios y secundarios es más complejo dado el flujo sanguíneo, la difusión, la unión y las tasas de aclaramiento que se encuentran en los tumores, pero aun se aplican los principios básicos.[6]

4. CONCLUSIONES

Como se ha visto en los ejemplos mostrados en este trabajo, la Química Biortogonal, a través de la Química Clic, ofrece nuevas herramientas más eficaces para el tratamiento y la detección de ciertas enfermedades.

Por ejemplo, el ensamblaje *in vivo* podría utilizarse para mejorar la administración de fármacos terapéuticos mediante la introducción de pequeñas moléculas que faciliten el transporte, por ejemplo, a través de la barrera hematoencefálica, del endotelio de los vasos sanguíneos, o de la pared intestinal, seguido de un ensamblaje covalente específico.

A su vez, esta técnica también puede proporcionar información sobre la concentración de fármacos o marcadores metabólicos marcados con etiquetas químicas en diferentes compartimentos de los tejidos.

Finalmente, como se ha demostrado, la química *in vivo* muestra una gran promesa para los biomarcadores de imagen y los agentes dirigidos con isótopos.

ABREVIATURAS

Tz: tetrazina.

PMT: tetrazinas modificadas con polímeros.

TCO: trans-cicloocteno.

PET: tomografía de emisión de positrones.

REFERENCIAS

[1] https://en.m.wikipedia.org/wiki/Bioorthogonal_chemistry

[2] <https://www.nature.com/articles/s43586-021-00028-z>

[3] https://cienciaysalud.laverdad.es/6_3_36.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.es%2F

[3] <https://theconversation.com/amp/nobel-prize-how-click-chemistry-and-bioorthogonal-chemistry-are-transforming-the-pharmaceutical-and-material-industries-191995>

[4] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136759312030123X>

[5] <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1113466109>

[6] Neal K. Devaraj, Greg M. Thurber, Edmund J. Keliher, Brett Marinelli, and Ralph Weissleder. March 12, 2012. Reactive polymer enables efficient *in vivo* bioorthogonal chemistry.

[7] Mike L.W.J. Smeenk, Jordi Agramunta, Kimberly M. Bongers. 3 November 2020. Recent developments in bioorthogonal chemistry and the orthogonality within.

[8] Samuel L. Scinto, Didier A. Bilodeau, Robert Hincapie, Wankyu Lee, Sean S. Nguyen, Minghao Xu, Christopher W. Am Ende, M. G. Finn, Kathrin Lang, Qing Lin, John Paul Pezacki, Jennifer A. Prescher, Marc S. Robillard y Joseph M. Fox. 15 April 2021. Bioorthogonal chemistry. Article number: 30 (2021). *Nature Reviews Methods Primers*.



Claudia Aranda Bonaño, María de las Mercedes Gata Vázquez y Cristian Picoñ Andrés, Grado en Química, 4º curso.