

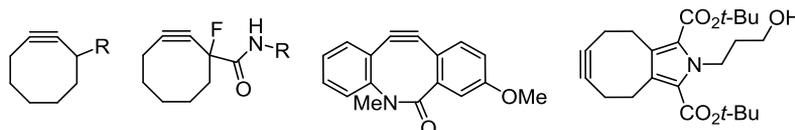
Успехи в синтезе циклооктинов для промотируемого напряжением цикла азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения

Евгений Г. Чупахин¹, Михаил Ю. Красавин^{1,2*}

¹ Институт живых систем, Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
ул. Университетская, 2а, Калининград 236016, Россия; e-mail: chupakhinevgen@gmail.com

² Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетский пр., 26, Петергоф, Санкт-Петербург 198504, Россия
e-mail: mkrasavin@hotmail.com

Поступило 28.02.2018
Принято после доработки 17.04.2018



В обзоре показано все разнообразие циклооктинов, представленных в литературе на данный момент. Обобщены и систематизированы методы их синтеза и рассмотрено применение циклооктинов для целей молекулярной биологии и клеточных технологий. Проанализирована важность циклооктинов для реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения: высокая реакционная способность циклооктинов позволяет проводить реакцию в мягких условиях и в отсутствие катализатора.

Ключевые слова: циклооктины, визуализация живой клетки, клик-реакции *in situ*, реакция азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения, реакция SPAAC, флуоресцентная микроскопия.

Впервые изученная Михаэлем¹ реакция циклоприсоединения между алкином и органическим азидом приобрела статус рутинного синтетического метода после публикации работ Хьюсгена.² Однако реакция, обычно проводимая при повышенных температурах и без катализатора, испытала возрождение после независимого открытия Шарплессом³ и Мелдалом⁴ возможности значительно ускорить циклоприсоединение при добавлении к реакционной смеси солей Cu(I). В литературе такой формат реакции часто называют катализируемым медью азид-алкиновым циклоприсоединением (copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition – CuAAC). Изучение механизма и кинетики реакции CuAAC⁵ и синтез новых реагентов для этого типа реакций привели к созданию методов так называемой клик-химии, которые занимают важное место в области получения биоконъюгатов (химически модифицированных биологических макромолекул). Специалисты в области биохимии и биоорганической химии крайне заинтересованы в новых способах модификации биологических молекул, которые позволили бы наблюдать за процессами (например, с помощью техники флуоресцентной конфокальной микроскопии⁶) в живой системе

(на клеточном уровне или даже на уровне целого организма). Стратегия модификации макромолекул в живых клетках с помощью реакции CuAAC в принципе могла бы решить эту задачу.⁷ Однако использование токсичных солей меди как катализатора ограничивает возможности применения этой реакции.

Прорыв в области использования азид-алкинового циклоприсоединения в так называемом биоортогональном формате⁸ (проведение химической реакции в живых клетках или целых организмах без нарушения их биохимического функционирования) связан с тем наблюдением, что взаимодействие напряженного цикла циклооктина с фенилазидом проходит в отсутствие какого-либо катализатора с почти количественным выходом и высокой эффективностью.⁹ Такой тип реакции получил название "промотируемое напряжением цикла азид-алкиновое [3+2]-циклоприсоединение" (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition – SPAAC). Группа Бертоцци обратила внимание на эту реакцию, так как ее можно было провести в живых клетках, аналогично реакции CuAAC, но без возможных токсических эффектов со стороны медного катализатора, то есть по сути живая клетка в этом случае становится своего рода реакционным сосудом с полным сохранением своих биохимических функций.⁸

* Здесь и далее в номере фамилия автора, с которым следует вести переписку, отмечена звездочкой.

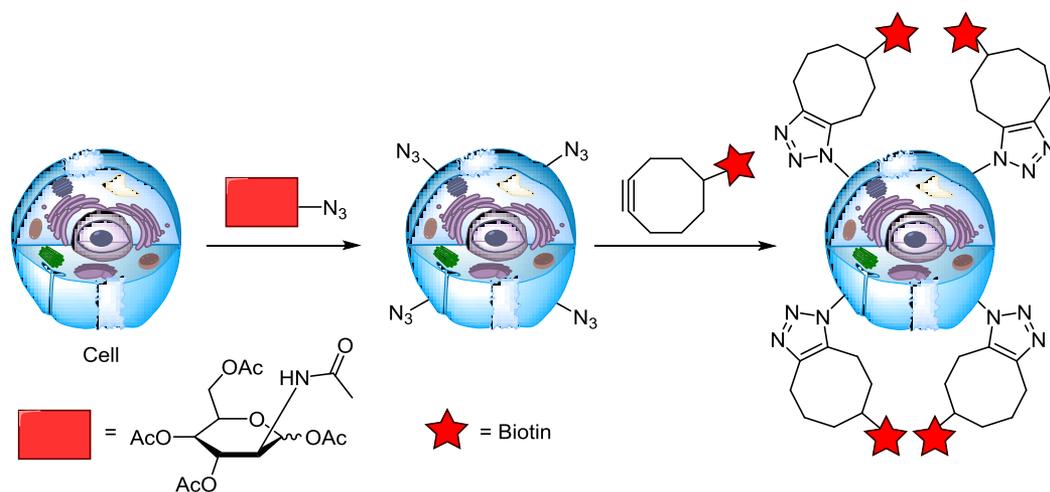


Рисунок 1. Схема эксперимента для проверки биоортогональности реакции SPAAC.

С целью проверить возможность использования реакции SPAAC для селективной метки пептидогликанов клеточной поверхности и последующей их визуализации методом конфокальной микроскопии был поставлен принципиально важный эксперимент.¹⁰ В ходе этого эксперимента живые клетки росли на питательной среде, в которую был добавлен *N*-(азидоацетил)маннозамин. Молекулы этого модифицированного углевода распознавались биосинтетическими ферментами и, как следствие, успешно использовались живыми клетками для синтеза полисахаридов на клеточной поверхности. В результате последние содержали в своей структуре азидные группы. Далее воздействуя на меченные азидными группами клетки циклооктином, содержащим в своей структуре биотин, были получены продукты реакции циклоприсоединения. В результате такой реакции мембраны клеток уже содержали биотин в составе пептидогликанов. Последующее связывание биотина с флуоресцентно-мечеными стрептавидином или авидином, обладающими крайне высоким и специфическим сродством к биотину, позволило провести селективную визуализацию поверхности клеток методом конфокальной микроскопии. На рис. 1 представлена схема эксперимента, который был впервые проведен для проверки принципиальной возможности осуществления биоортогональной реакции SPAAC.

Визуализация пептидогликанов с использованием циклооктинов представляет собой важную альтернативу методам, основанным на аффинном связывании.¹¹ Циклоприсоединение с участием циклооктинов и азидов проходит достаточно быстро, в мягких условиях, селективно, при этом продукты реакции нетоксичны для живой системы, в которой проходит данная реакция. Циклооктины с различными заместителями (биотин, родамин, флуоресцеин) применялись при исследовании различных гликановых структур эмбрионов рыбки данио рерио (*Danio rerio*, Zebrafish).¹² Эти эксперименты позволили разработать ряд важных реагентов и методов для решения задачи биоортогональной визуализации отдельных молекул в живом

организме с использованием техники конфокальной микроскопии. Однако использование флуоресцентных групп как заместителей в одном из компонентов реакции SPAAC может приводить к искажению результатов, полученных техникой конфокальной флуоресцентной микроскопии. Если применять флуоресцирующий циклооктин (а этот реагент часто требуется в избытке), оставшееся после прохождения реакции SPAAC избыточное его количество (если его тщательно не отмыть) приводит к "засвету" сигнала флуоресценции триазольного продукта. Чтобы обойти это затруднение, можно использовать такие циклооктины, которые сами по себе не являются флуоресцентными и для которых только продукт реакции циклоприсоединения обеспечивает детектируемую методом конфокальной микроскопии флуоресценцию.¹³

Циклооктиновый компонент может быть использован более чем в одном типе реакции с целью синтеза биоконъюгатов. Помимо реакции SPAAC (наиболее популярное биоортогональное превращение), достаточно часто используется [3+2]-циклоприсоединение между циклооктинами и нитрилоксидами, [4+2]-циклоприсоединение с участием 1,2,4,5-тетразинов и 1,2,4-триазинов,¹⁴ а также взаимодействие с тетрафенилциклопентадиеноном.¹⁵ Циклооктины применяются для решения разнообразных задач, связанных с модификацией биологических макромолекул. Так, 1,2,4,5-тетразины были использованы в исследовании процесса биосинтеза пептидогликанов мембран клеток данио рерио (рис. 2).¹⁶

Циклооктиновый фрагмент был успешно использован для химической модификации молекулы ДНК в процессе ее твердофазного синтеза.¹⁷ К концевой группе 5'-ОН одноцепочечной молекулы ДНК, полученной фосфорамидитным методом, был присоединен циклооктиновый фрагмент, содержащий линкер с амидофосфитной группой, что позволило провести реакцию сочетания в условиях твердофазного синтеза. Циклооктин в дальнейшем модифицировали с помощью реакции [3+2]-циклоприсоединения с нитрилоксидами, которые получали из соответствующих альдоксимов *in situ* (рис. 3).

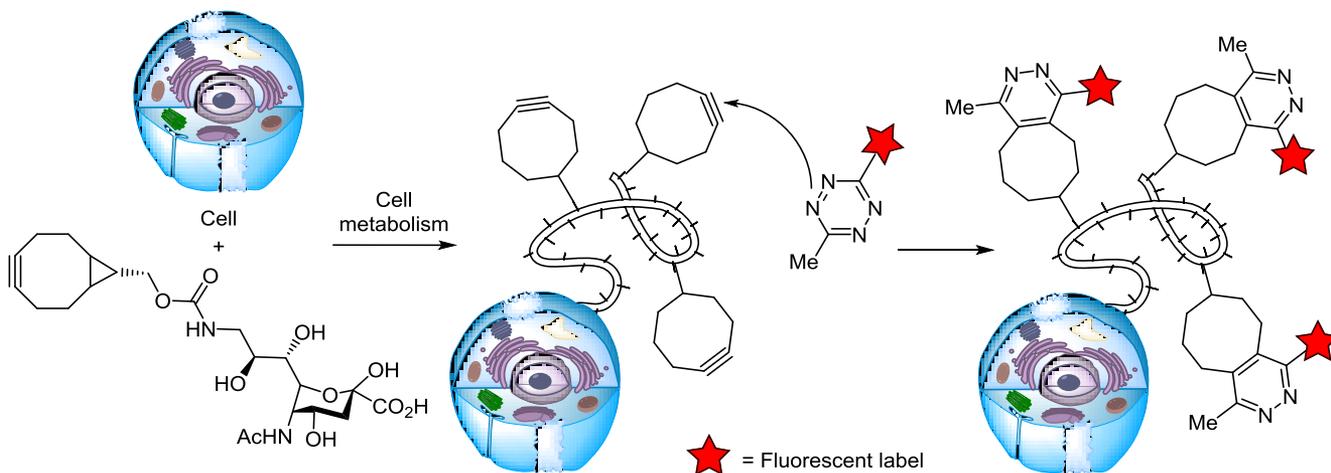


Рисунок 2. Схема использования флуоресцентных тетразинов для метки циклооктинов на клеточной поверхности по реакции [4+2]-циклоприсоединения.

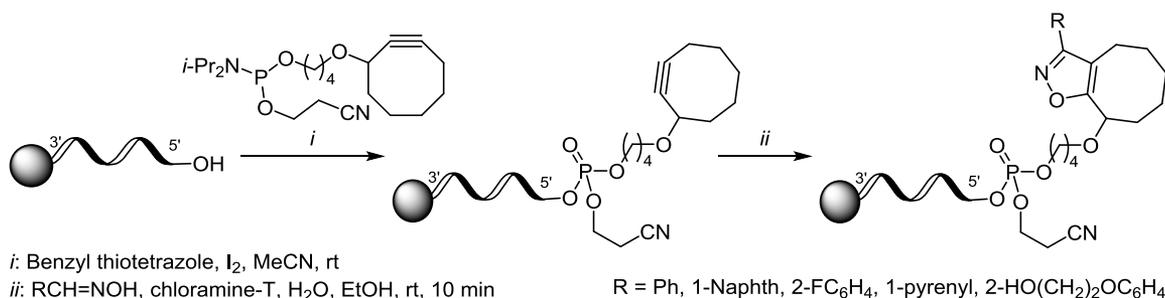


Рисунок 3. Модификация ДНК в процессе твердофазного синтеза циклооктином и последующая реакция [3+2]-циклоприсоединения с нитрилоксидом.

Реакция промотируемого напряжением цикла азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения была ключевой в ходе получения бициклических матриц для высокопродуктивного синтеза библиотеки химических соединений, исследуемых в качестве ингибиторов каспазы-1.¹⁸

Анализ литературы показывает, что циклооктины проявляют достаточную реакционную способность для их использования в лимитированных по времени процессах, в то же время они достаточно стабильны и совместимы с множеством функциональных групп. Однако в большинстве исследований по селективной визуализации живых клеток в основном используют несколько самых популярных циклооктинов. Это создает ощущение ограниченности доступного современным исследователям арсенала разнообразных циклооктинов. К сожалению, в литературе отсутствует обзорная информация о том, какие типы циклооктинов были синтезированы и использовались в азид-алкиновом циклоприсоединении на сегодняшний день. В данном обзоре рассмотрено разнообразие циклооктинов для реакций SPAAC и связанных с ними реакций, о которых сообщалось в литературе, с акцентом на методах их синтеза, особенностях кинетики, связанных с ними фотофизических свойствах и пригодности для биоортогональной визуализации.

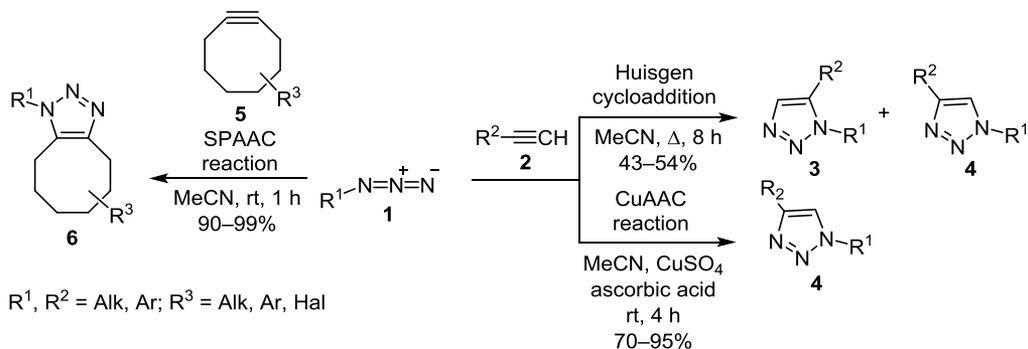
1. ТИПЫ РЕАКЦИЙ С ЦИКЛООКТИНАМИ

1.1. Азид-алкиновое [3+2]-циклоприсоединение

В варианте циклоприсоединения Хьюгенса (схема 1) из азида **1** и алкина **2** образуется смесь 1,5- и 1,4-замещенных 1,2,3-триазолов (структуры **3** и **4** соответственно).^{19a} В условиях катализа реакции солями одновалентной меди (реакции CuAAC) образуется единственный 1,4-изомер **4** с высоким выходом (схема 1).^{19b} Реакция SPAAC с несимметрично замещенными циклооктинами **5** преимущественно приводит к смеси изомеров **6**, образующихся примерно в равных количествах (схема 1).^{19c} Константа скорости реакции для различных замещенных циклооктинов составляет от $1.3 \cdot 10^{-3}$ до $960 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.^{19d} Реакция протекает достаточно быстро и селективно, что позволяет использовать ее для селективной модификации молекул живых клеток и целых организмов. Наличие двух региоизомеров в продукте реакции не влияет на интенсивность сигнала флуоресценции и не приводит к искажению результатов, полученных методом конфокальной микроскопии.

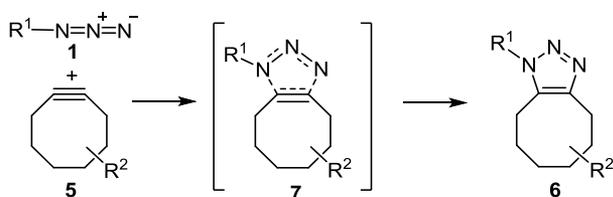
Движущей силой для реакции SPAAC с участием циклооктина является напряжение тройной связи, угол при которой в восьмичленном цикле близок к 163° .²⁰ Результирующая энергия напряжения тройной связи составляет около 18 ккал/моль.²¹ Это снижает разницу

Схема 1. Различные варианты реакции азид-алкинового циклоприсоединения



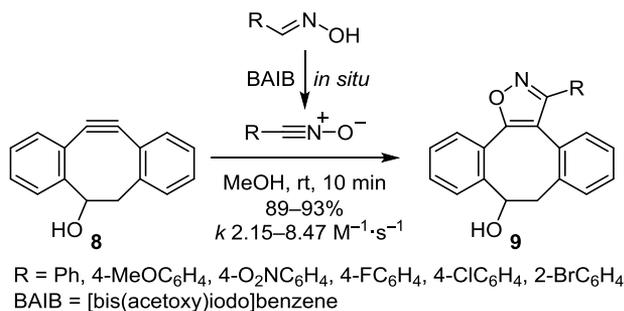
в энергиях основного и переходного состояний (активационный барьер) и приводит к существенному ускорению реакции в сравнении с ациклическими алкинами.²² На схеме 2 показано предполагаемое переходное состояние (интермедиат **7**) прототируемого напряжением цикла азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения.

Схема 2. Возможное переходное состояние в ходе реакции SPAAC



1.2. [3+2]-Циклоприсоединение циклооктинов к нитрилоксидам

Исследование реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения между дибензоциклооктином **8** и нитрилоксидами с образованием соответствующих изоксазолов **9** показало, что значения константы скорости реакции второго порядка в 57 раз выше, чем у подобной реакции с бензиламидами (схема 3).²³

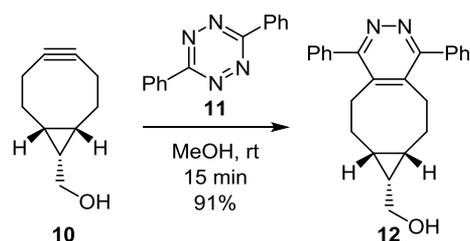
Схема 3. Реакция [3+2]-циклоприсоединения между дибензоциклооктином **8** и нитрилоксидами

Нитрилоксид генерировали *in situ* в присутствии циклооктина под действием мягкого окислителя бис-(ацетокси)иодобензола (BAIB). Условия реакции поз-

воляют провести процессы SPAAC и [3+2]-циклоприсоединения к нитрилоксидам последовательно, что дает возможность избирательно получать полифункциональные соединения и материалы с использованием простых с технической точки зрения синтетических решений.

1.3. [4+2]-Циклоприсоединение циклооктинов к 1,2,4,5-тетразинам

Систематическое изучение реакций циклоприсоединения 1,2,4,5-тетразинов с различными диенофилами, в том числе и циклооктином, было проведено Шустером.²⁴ Группой Ванга реакция была изучена на модельных соединениях – бицикло[6.1.0]нонине **10** и замещенном 1,2,4,5-тетразине **11** – в метаноле и приводила к образованию пиридазина **12** (схема 4). Было обнаружено, что значения константы скорости реакции второго порядка изменялись в диапазоне от 0.58 до $125 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ в зависимости от заместителей в молекуле тетрамина.²⁵

Схема 4. Модельная реакция [4+2]-циклоприсоединения бицикло[6.1.0]нонина **10** с 1,2,4,5-тетразином **11**

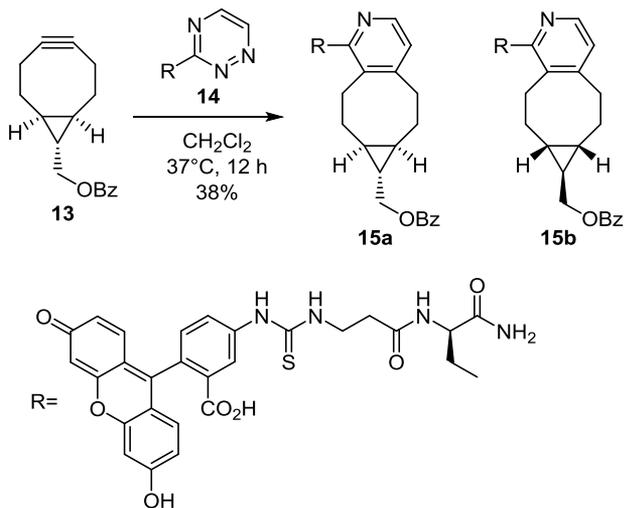
Были получены аминокислоты, содержащие циклооктиновый заместитель, которые использовали для внутриклеточной визуализации белков с применением техники FRET (fluorescence resonance energy transfer).²⁶ Синтетические аминокислоты с циклооктиновым заместителем встраивались в белки живых клеток (в ходе их метаболизма). В результате белки содержали циклооктин в боковых фрагментах аминокислот. Действуя на такие белки 1,2,4,5-тетразином, удалось селективно внести флуоресцентную модификацию. Высокая эффективность такого типа реакции и возможность настройки реакционной способности

1,2,4,5-тетразинов открывают широкие возможности для оптимизации экспериментов, связанных с получением модифицированных биологических макромолекул с разнообразными по структуре реагентами.

1.4. [4+2]-Циклоприсоединение циклоксинов к 1,2,4-триазинам

Исследована модельная реакция бициклононилбензоата **13** с 1,2,4-триазином **14** с образованием смеси (1:1) диастереомерных бициклононапиридинов **15a,b** (схема 5).¹⁴ Диастереомерия возникает за счет присутствия объемного заместителя R в 1,2,4-триазине **14**.

Схема 5. Реакция циклоприсоединения бицикло[6.1.0]нонина **13** с 1,2,4-триазином **14**



Наблюдаемая константа скорости этой реакции составила $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, что намного ниже, чем скорость подобной реакции с 1,2,4,5-тетразинами. Однако оптимизация растворителей и концентрации реагентов в растворе позволяет приблизиться к скорости, сопоставимой с азид-алкиновым циклоприсоединением, и тем самым расширить круг используемых реагентов для реакций циклоприсоединения с участием циклоксинов с целью избирательной модификации биологических молекул.

2. ЦИКЛООКТИНЫ ДЛЯ РЕАКЦИИ СПААС

2.1. Циклоксины первого поколения

Группой Бертоцци была получена 4-[(циклокт-2-ин-1-илокси)метил]бензойная кислота (**16**) и изучена ее реакционная способность в реакциях циклоприсоединения с 2-азидэтанолом, бензилазидом, *N*-бутил-2-азидоацетамидом. Во всех случаях наблюдался близкий к количественному выход соответствующих триазольных продуктов в виде двух региоизомерных форм, образующихся в равных соотношениях.¹⁰ Полученные результаты показали, что скорости реакций СПААС и СуААС сопоставимы. Циклоксины, подобные кислоте **16**, то есть не содержащие гетероатомов в структуре цикла, конденсированных

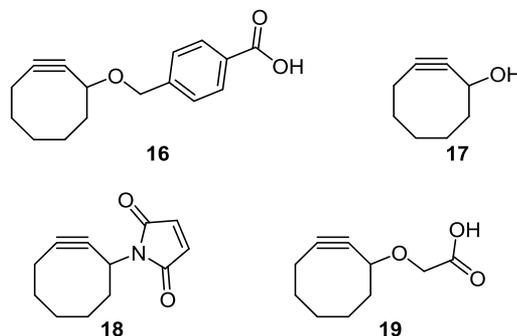


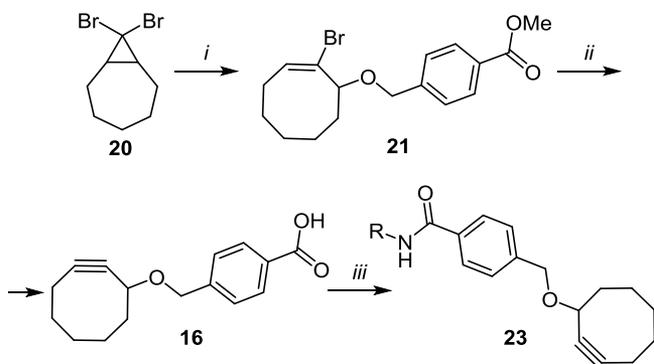
Рисунок 4. Циклоксины первого поколения.

циклов или атомов фтора в качестве заместителей, мы предлагаем относить к циклоксинам первого поколения. Эти соединения обладают приемлемыми характеристиками для использования их *in situ* в клихимии.²⁷ Многие уже фигурируют в каталогах специализированных поставщиков реагентов и успешно используются в экспериментах, связанных с визуализацией биомолекул в живых клетках. Структуры наиболее важных циклоксинов первого поколения **16–19** приведены на рис. 4.

Циклоксины первого поколения сыграли важную роль в развитии методологии СПААС. Ниже рассмотрены методы получения отдельных представителей этой группы реагентов.

Для проверки возможности использования промотируемого напряжением цикла азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения для биоортогональной клихимии было получено производное **23**, содержащее в структуре линкер с присоединенным биотином (схема 6).¹⁰

Схема 6. Получение конъюгата циклоксины с биотином **23**



i: HOCH₂C₆H₄CO₂Me, AgClO₄, MeOH, PhMe, rt, 2 h (99%)

ii: a) NaOMe, DMSO, rt, 20 min

b) NaOH (10 equiv), H₂O–1,4-dioxane, 1:5, rt, 24 h (74% in 2 steps)

iii: a) C₆F₅CO₂CF₃, Py, rt, 4 h

b) RNH₂ **22**, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 1 h (51% in 2 steps)

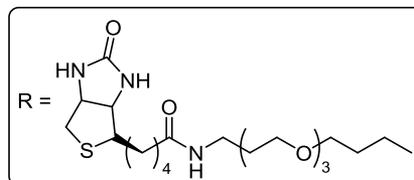
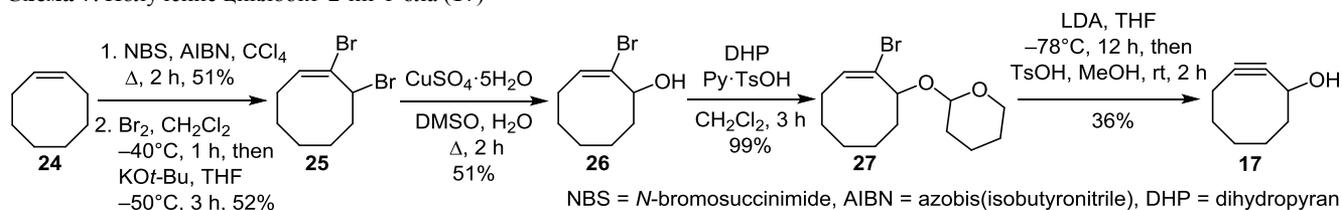


Схема 7. Получение циклоокт-2-ин-1-ола (17)



В ходе синтеза 8,8-дибромбисцикло[5.1.0]октан (**20**) подвергали действию перхлората серебра. Образующийся в результате скелетной перегруппировки аллильный катион взаимодействовал с метил-4-(гидроксиметил)бензоатом с образованием бромциклооктана **21**.²⁸ Далее под действием основания происходило элиминирование HBr и гидролиз сложноэфирной группы, приводя к образованию кислоты **16**. Модифицированный линкер биотин **22** сочетали с кислотой **16** по реакции амидирования, получая целевое соединение **23**. Молекула биотина может образовывать комплексы с белками стрептавидином и авидином. В случае, когда эти белки несут флуоресцентные группы (флуоресцин, родамин), полученные комплексы могут быть определены методом конфокальной флуоресцентной микроскопии,²⁹ что используют для избирательной визуализации на клеточном уровне.³⁰

Брезе и сотр. воспользовались элегантной стратегией синтеза важного строительного блока – циклоокт-2-ин-1-ола (**17**) (схема 7).³¹

На начальной стадии, которая представляет собой последовательное бромирование–элиминирование, циклооктен **24** был превращен в (*E*)-1,8-дибромциклоокт-1-ен (**25**) с использованием литературных процедур.³² Далее дибромциклооктен **25** был подвергнут гидролизу в системе ДМСО–вода с образованием соответствующего аллилового спирта **26**. Гидроксильную группу спирта **26** защищали тетрагидропирановой группой с получением производного **27**. Необходимость защиты гидроксильной группы спирта **26**

заклучалась в том, что реакция элиминирования с незащищенным соединением **26** проходила с низким и нестабильным выходом циклоокт-2-ин-1-ола (**17**). Полученное производное **27** подвергали элиминированию действием диизопропиламида лития (LDA), что после снятия тетрагидропирановой защиты привело к получению циклоокт-2-ин-1-ола (**17**).

Производные **18**, **28–30** были получены из циклооктинола **17** по реакции Мицунобу (схема 8).

Производное **18** интересно с точки зрения возможности использования его в качестве реагента, способного образовывать кросс-сшивки, например, с тиольными группами в биологических макромолекулах. Для проверки этой гипотезы соединение **18** было предварительно введено в реакцию с этил-4-азидобензоатом. Полученную смесь региоизомерных триазолов подвергли далее действию *трет*-бутилтиола и получили соединение **31** в виде смеси диастерео- и региоизомеров, что подтвердило возможность использования малеимидного производного для создания кросс-сшивок между азидами и тиолами. Из производного **30** было получено соединение **32**, содержащее фрагмент флуоресцеина, которое использовалось в эксперименте по детектированию азидных меток в живых клетках с применением техники конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Был также синтезирован циклооктин **19**, который содержал фрагмент гликолевой кислоты,³³ представляющий собой более гидрофильную альтернативу соединения **16** с линкером иной природы. В этом случае также исходили из 8,8-дибромбисцикло[5.1.0]-

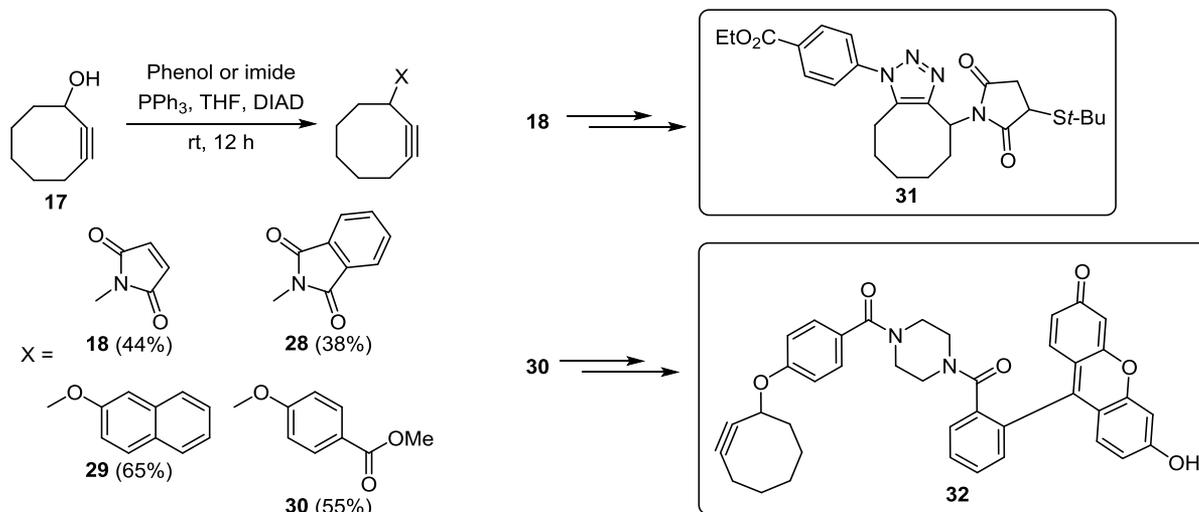
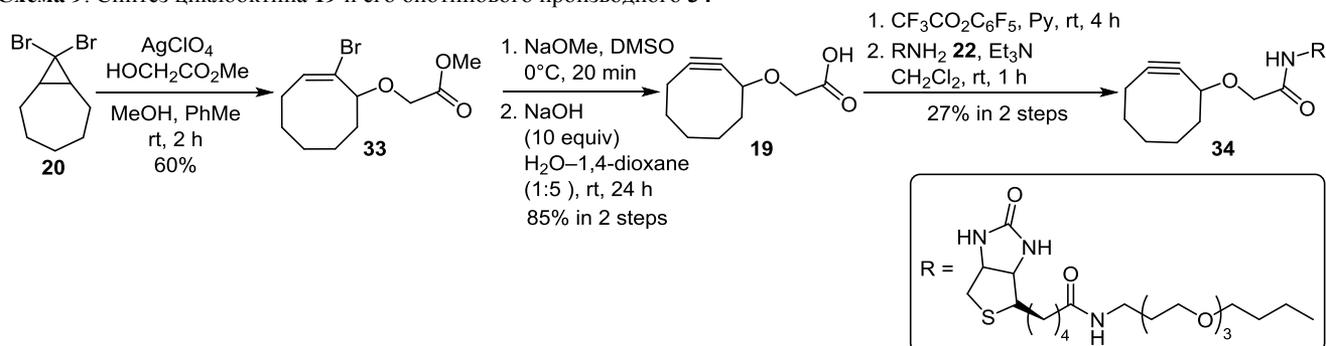
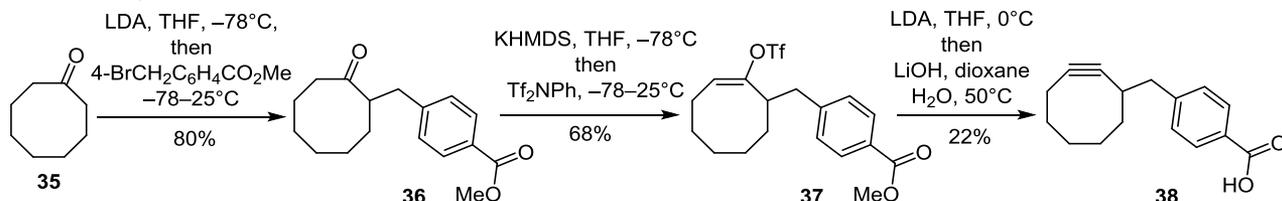
Схема 8. Реакция Мицунобу для получения производных **18**, **28–30** и их модификации

Схема 9. Синтез циклооктина **19** и его биотинового производного **34**Схема 10. Получение метил-4-(циклоокт-2-инилметил)бензоата (**38**)

октана **20** (схема 9). Образующийся в ходе скелетной перегруппировки последний аллильный катион взаимодействовал с метилгликолятом с образованием промежуточного соединения **33**. Последующие однореакторные элиминирование и гидролиз превращали соединение **33** в циклооктин **19**. Биотинсодержащий синтон **22** присоединяли с помощью реакции амидирования. Полученный циклооктин **34** был исследован в качестве реагента для внутриклеточной визуализации поверхности живых клеток с помощью флуоресцентного мечения стрептавидином.

Несколько иной подход был применен в синтезе метил-4-(циклоокт-2-инилметил)бензоата (**38**) (схема 10).³³

Для синтеза целевого соединения исходный циклооктанон (**35**) подвергали действию LDA и метил-4-(бромметил)бензоата, получая промежуточный кетон **36**. Последний действием KHMDS и *N*-фенилбис(трифторметансульфонамида) превращали в винил-

трифлат **37**. Элиминирование трифлатной группы в соединении **37** под действием LDA и последующий щелочной гидролиз сложноэфирной группы привели к получению 4-(циклоокт-2-инил)метилбензойной кислоты (**38**). Соединение **38** было получено в рамках исследования скорости реакции SPAAC с участием его биотинового производного в сравнении со скоростью реакции фторированного аналога **39** (рис. 5). Циклооктин **38** был исследован в модельной реакции с бензилазидом в дейтерированном ацетонитриле (CD_3CN), константа скорости реакции SPAAC составила $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Такой результат показал, что и для этого типа циклооктина скорость реакции сопоставима со скоростью реакции CuAAC.

Циклооктины первого поколения обладают достаточной реакционной способностью и стабильностью для использования в качестве простых и доступных реагентов, для решения задач клик-химии в живых

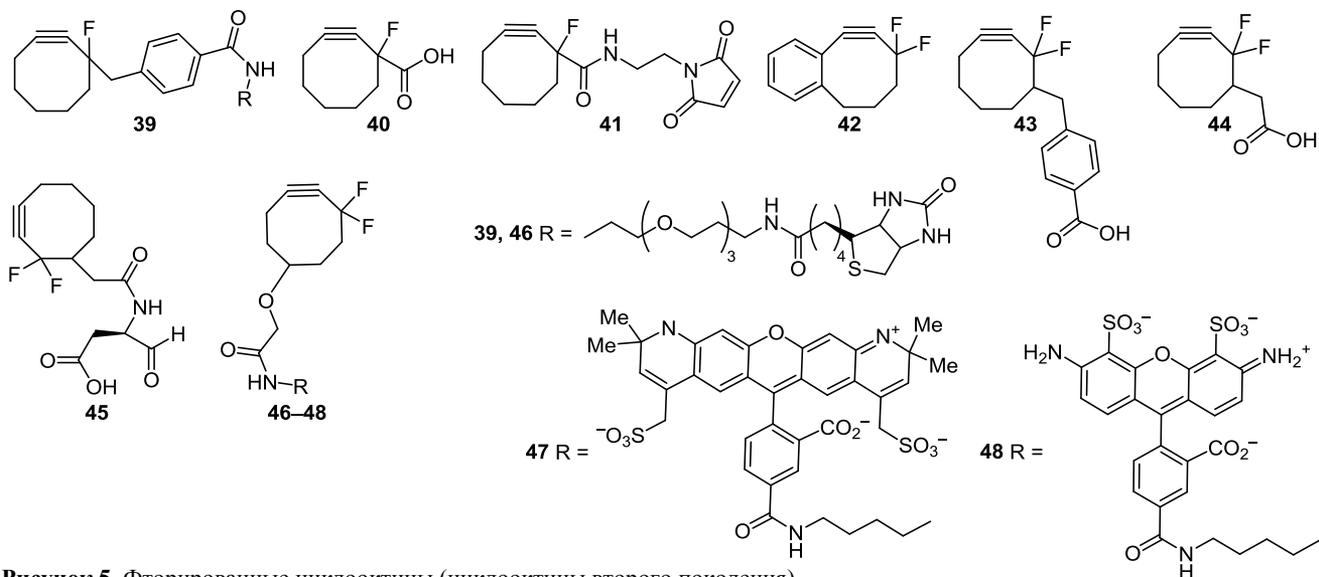


Рисунок 5. Фторированные циклооктины (циклооктины второго поколения).

системах без нарушения их функционирования. В то же время их можно получить из коммерчески доступных соединений с использованием детально проработанных и подробно описанных в литературе синтетических процедур. Для дальнейшей модификации гидроксильной или карбоксильной групп циклооктинов первого поколения можно с успехом использовать реакцию Мицунобу и амидирование активированных эфиров, что позволяет получать циклооктины с заданными фотофизическими свойствами.

2.2. Фторированные циклооктины (циклооктины второго поколения)

Механизм промотируемого напряжением цикла азидалкинового [3+2]-циклоприсоединения предполагает, что в реакцию вступают алкины, обладающие низкой энергией НСМО и азиды с высокой энергией ВЗМО. Исходя из этого было сделано предположение, что введение в структуру циклооктина заместителей с высокой электроотрицательностью способно повысить его реакционную способность.³⁴

В качестве такого заместителя был предложен фтор. Соответствующие соединения **39–48**, содержащие в своей структуре атомы фтора, но не имеющие конденсированных ароматических циклов или гетероатомов, мы предлагаем относить ко второму поколению циклооктинов (рис. 5).

Ниже рассмотрены методы синтеза наиболее востребованных фторсодержащих циклооктинов для получения биоконъюгатов.

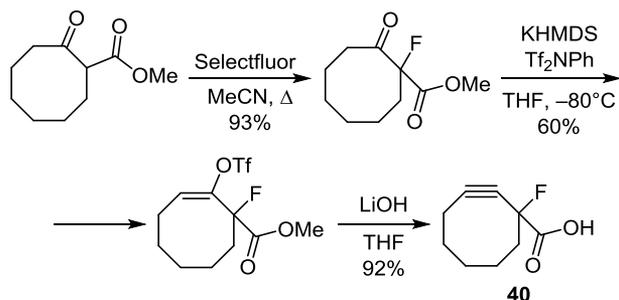
Синтез монофторированного биотинсодержащего соединения **39** (схема 11)³³ был осуществлен с использованием подхода, подобного примененному в синтезе соединения **38**. Исходный 2-фторциклооктанон (**49**) был превращен в метил-4-[(1-фтор-2-оксоциклооктил)метил]бензоат (**50**). Под действием KHMDS и *N*-фенилбис(трифторметансульфонамида) соединения **50** было превращено в винилтрифлатное производное **51**. Последующее элиминирование и гидролиз соединения **51** привели к образованию 4-[(1-фторциклоокт-2-инил)метил]бензойной кислоты, амидированием которой с участием амина **22** было получено целевое производное **39**.

Исследование кинетики реакции SPAAC с циклооктином **39** подтвердило ожидаемый существенный прирост константы скорости реакции, значение которой составило уже $4.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

Шмидт и сотр. успешно применили стратегию, основанную на клик-реакции, для получения кросс-

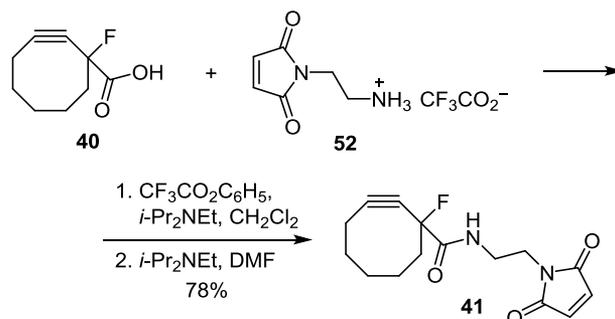
сшивки между субъединицами В токсина Шиги (STxB) и содержащими азидную группу пролекарствами с целью доставки последних в определенные органы и ткани.³⁵ В ходе этой работы был осуществлен синтез 1-фторциклоокт-2-инкарбоновой кислоты **40** по аналогии с синтезом соединения **39** (схема 12).

Схема 12. Получение 1-фторциклоокт-2-инкарбоновой кислоты **40**



Циклооктинкарбоновая кислота **40** была подвергнута дальнейшей модификации с целью получения малеимидного производного **41** (схема 13).

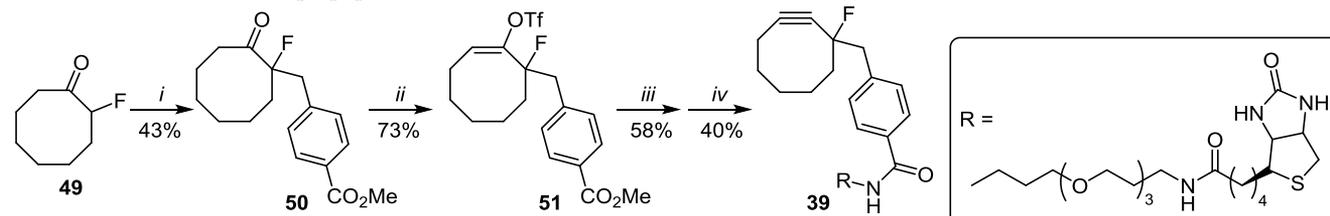
Схема 13. Получение малеимидного производного циклооктинкарбоновой кислоты **41**



Соединение **41** было использовано для создания кросс-сшивки между органическими азидами и тиольными группами субъединиц В токсина Шиги (рис. 6).

С целью увеличения реакционной способности фторированных циклооктинов было получено³⁶ "гибридное" соединение, содержащее конденсированный бензолный цикл и два атома фтора по соседству с тройной связью, так называемый монобензодифторциклооктин **42**. Исходя из ключевого интермедиата дифторбензосуберенона **54**, синтезированного фторированием

Схема 11. Получение монофторированного циклооктина **39**



i: a) LDA, THF, -78°C ; b) $\text{BrCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Me}$, -78 – -25°C ; *ii*: a) KHMDS, THF, -78°C ; b) Tf_2NPh , -78 – -25°C
iii: a) LDA, THF, 0°C ; a) LiOH, dioxane, H_2O , 50°C ; *iv*: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, *i*- Pr_2NEt ; b) RNH_2 **22**, *i*- Pr_2NEt

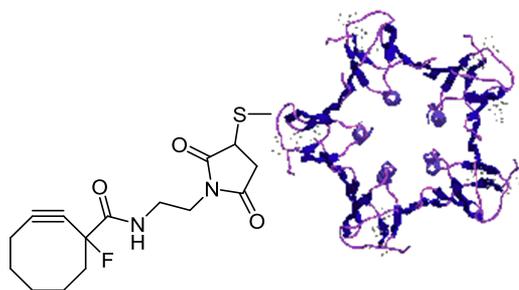
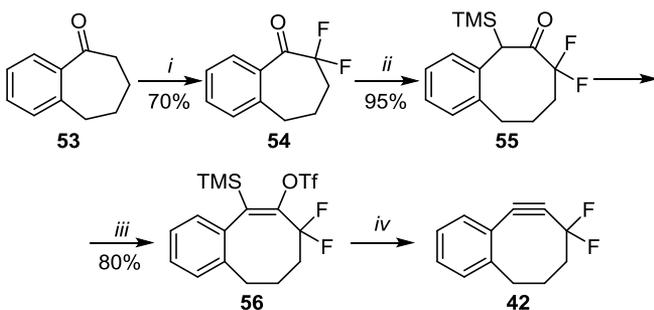


Рисунок 6. Конъюгат между малеимидным производным фторциклооктина **41** и субъединицей В токсина Шиги (STxB).

исходного бензосуберенона (**53**), в результате катализируемого кислотой Льюиса расширения цикла был получен триметилсилилкетон **55**. Последний был превращен в трифлат **56** и, далее, в целевой монобензодифторциклооктин **42** (схема 14).

Схема 14. Синтез монобензодифторциклооктина **42**

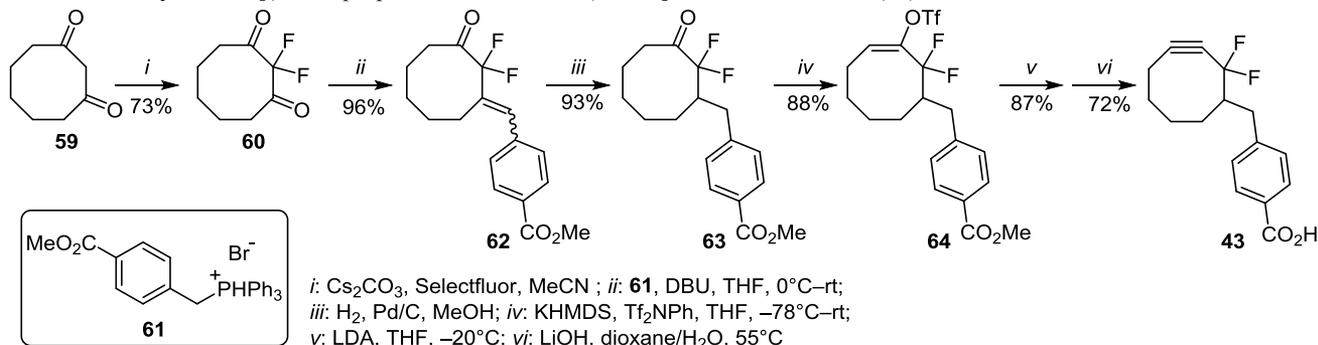


i: a) Hexylamine, TFA, Cy, Δ , 12 h
b: Selectfluor, MeCN, Na_2SO_4 , Δ , 12 h; c) 3 M HCl, Δ , 10 min
ii: a) 2 M AlMe_3 , CH_2Cl_2 , -78°C , 15 min; b) TMSCHN_2 , 0°C , 5 min
iii: a) 0.5 M KHMDS , -78°C , 1 h; b) Tf_2O , -45°C , 3 h
iv: CsF, MeCN, rt, 30 min

Циклооктин **42** из-за своей крайне высокой реакционной способности претерпевал гомотримеризацию с образованием двух асимметричных диастереомерных форм **57** и **58**, пространственная изомерия которых была подтверждена методом PCA (схема 15).

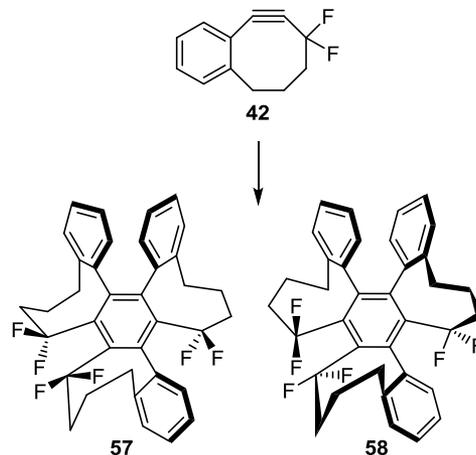
Дифторциклооктин **43**, функционализированный фрагментом 4-метилбензойной кислоты, был получен с использованием новой стратегии из 1,3-циклооктандиона (**59**) (схема 16).³⁷

Схема 16. Получение 4-[(2,2-дифторциклоокт-3-ин-1-ил)метил]бензойной кислоты (**43**)



i: Cs_2CO_3 , Selectfluor, MeCN; *ii:* **61**, DBU, THF, 0°C –rt;
iii: H_2 , Pd/C, MeOH; *iv:* KHMDS , Tf_2NPh , THF, -78°C –rt;
v: LDA, THF, -20°C ; *vi:* LiOH, dioxane/ H_2O , 55°C

Схема 15. Гомотримеризация циклооктина **42**



Исходный 1,3-циклооктандион (**59**) синтезирован по ранее опубликованной методике³⁸ и подвергнут дифторированию с использованием реагента Selectfluor в стандартных условиях.³⁹ Полученный 2,2-дифтор-1,3-циклооктандион (**60**) был введен в реакцию Виттига с участием фосфониевой соли **61** и DBU, приводящую к образованию соединения **62**. Олефин **62** был восстановлен до насыщенного соединения **63** и, далее, превращен в винилтрифлат **64**. Обработка винилтрифлата **64** LDA и последующий гидролиз сложноэфирной группы дали конечный дифторциклооктин **43** с общим выходом 36% (схема 16).

Во многом аналогичный подход был применен в синтезе 2-(2,2-дифторциклоокт-3-ин-1-ил)уксусной кислоты (**44**), исходным соединением был 2,2-дифтор-1,3-циклооктандион (**60**) (схема 17).³⁷

Взаимодействием дифторциклооктандиона **60** с фосфонийодидом **65** получен олефин **66**. Последний восстановили до насыщенного промежуточного соединения **67**, которое затем было превращено в винилтрифлат **68**. Элиминирование под действием LDA и последующий гидролиз сложноэфирной группы привели к образованию целевого продукта **44**.

Для соединений **43** и **44** были измерены значения констант скорости реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения, которые в условиях модельной реакции с бензилазидом составили $4.2 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ и $5.2 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ соответственно. Это примерно в 4 раза

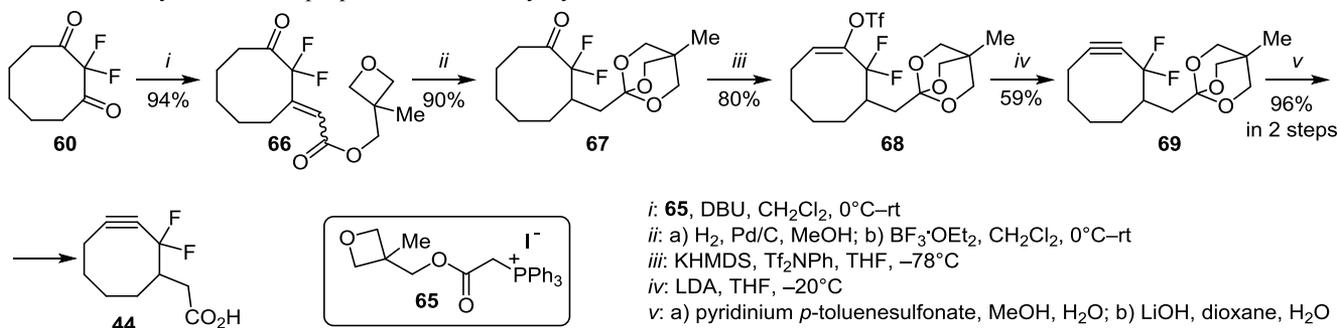
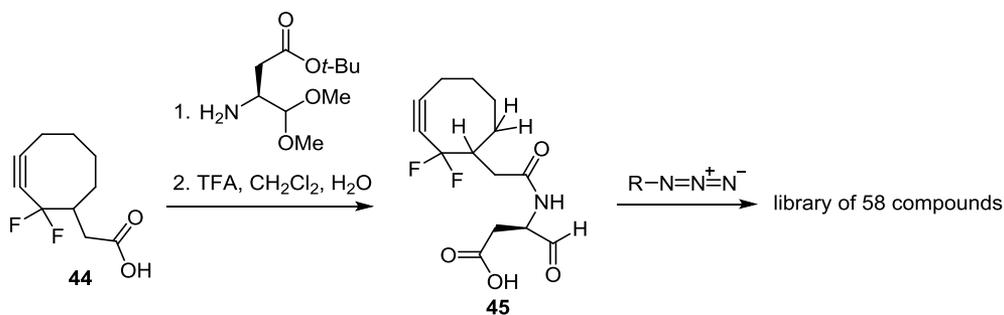
Схема 17. Получение 2,2-дифторциклоокт-3-инилуксусной кислоты **44**

Схема 18. Использование реакции SPAAC для синтеза библиотеки химических соединений ингибиторов каспазы-1



выше, чем скорость реакции с аналогичными циклооктинами, не содержащими атомов фтора.

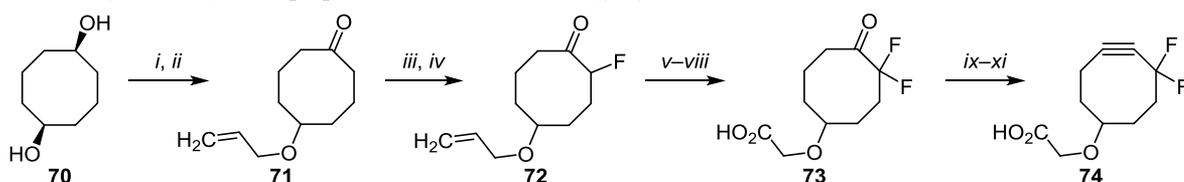
Продукты реакции SPAAC соединения **45** с азидами были исследованы в качестве ингибиторов каспазы-1. Соединение **45** было получено исходя из циклооктина **44**, как показано на схеме 18. Стоит отметить, что стратегия клик-химии оказалась пригодной для получения библиотеки, содержащей 58 соединений.¹⁸

В ходе исследований, направленных на развитие техники некатализируемой клик-химии для динамической визуализации *in vivo*, группа Бертоцци получила 2-[[6,6-дифторциклоокт-4-ин-1-ил]окси]уксусную кислоту (**74**) по оригинальной методике (схема 19).⁴⁰

Исходным соединением в синтезе циклооктина **74** служил *cis*-1,5-циклооктандиол (**70**), который в результате последовательных стадий моноаллилирования и окисления пиридинхлорохроматом был превращен в 5-(аллилокси)циклооктанон (**71**). Для ввода атомов фтора кетон **71** был конвертирован в промежуточный силиленольный эфир, на который действо-

вали реагентом Selectfluor, что привело к одновременному монофторированию и снятию силильной защитной группы, то есть получению 5-(аллилокси)-2-фторциклооктанона (**72**). Аналогичная последовательность реакций позволила получить из соединения **72** 5-(аллилокси)-2,2-дифторциклооктанон, аллильную группу которого окислили с помощью трихлорида рутения и периодата натрия и получили 2-(4,4-дифтор-5-оксоциклооктилокси)уксусную кислоту (**73**). Получение винилтрифлата и последующее элиминирование трифторметансульфоновой кислоты привели к целевому соединению **74**. В модельной реакции с бензилазидом была установлена константа скорости реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения, значение которой составило $7.3 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

Карбоксильная группа циклооктина **74** была функционализована флуорофорными (соединения **47**, **48**), а также биотиновым (соединение **46**) фрагментами; эти группы далее служили источниками флуоресцентного сигнала для визуализации процессов, происходящих в клетке *in vivo*.

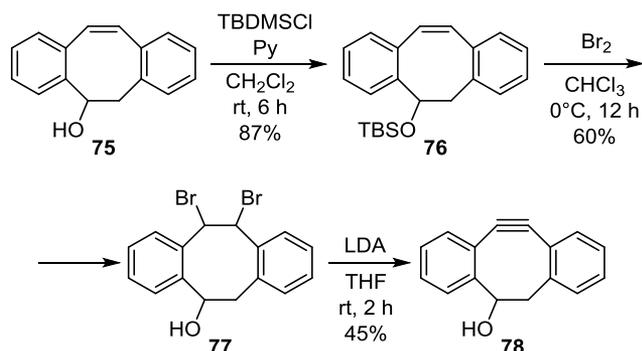
Схема 19. Получение 2-[[6,6-дифторциклоокт-4-ин-1-ил]окси]уксусной кислоты (**74**)

i: a) NaH, CH₂=CHCH₂Br, DMF, 0°C, 1 h; b) rt, 12 h (52%); *ii*: PCC, CH₂Cl₂, rt, 2.5 h (91%)
iii: LHMDS, Et₃SiCl, THF, –78°C–rt, 2.5 h (91%); *iv*: Selectfluor, DMF, 0°C, 1 h, 95%; *v*: KHMDS, –78°C, THF, 2 h
vi: a) Et₃SiCl, –78°C, THF, 30 min; b) rt, 1 h (97% in 2 steps); *vii*: Selectfluor, DMF, 0°C, 2.5 h (74%)
viii: a) RuCl₃·H₂O, NaO₄, MeCN, 0°C, 10 min; b) rt, 2.5 h (96%); *ix*: KHMDS, THF, –78°C, 1 h
x: Tf₂NPh, THF, rt, 30 min (47% in 2 steps); *xi*: LDA, THF, –15°C, 1.5 h (11%)

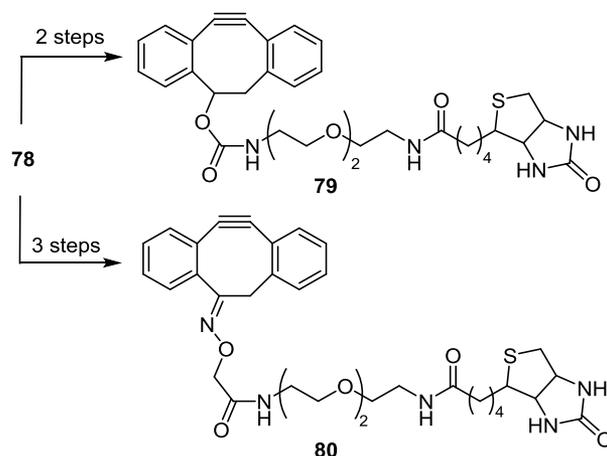
2.3. Дибензоциклооктины

Для повышения реакционной способности циклооктинового фрагмента были синтезированы и исследованы производные дибензоциклооктина.

Дибензоциклооктинол **78** был синтезирован по оригинальной методике (схема 20)⁴¹ из легкодоступного 5,6-дигидродибензо[*a,e*][8]аннулен-5-ола (**75**),⁴² гидроксильная группа которого была защищена *tert*-бутилдиметилсилильной группой (соединение **76**). Бромирование соединения **76** привело к образованию дибромиды **77**, дегидробромированием которого под действием LDA был получен целевой дибензоциклооктинол **78**. Последний обладал исключительной стабильностью и не вступал в реакции с такими нуклеофилами, как амины и тиолы. Реакционная способность соединения **78** была изучена в модельной реакции с бензилазидом, значение константы скорости которой составило $0.057 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, что примерно в два раза выше, чем у аналогичной реакции с дифторциклооктином **74**.

Схема 20. Получение дибензоциклооктинола **78**

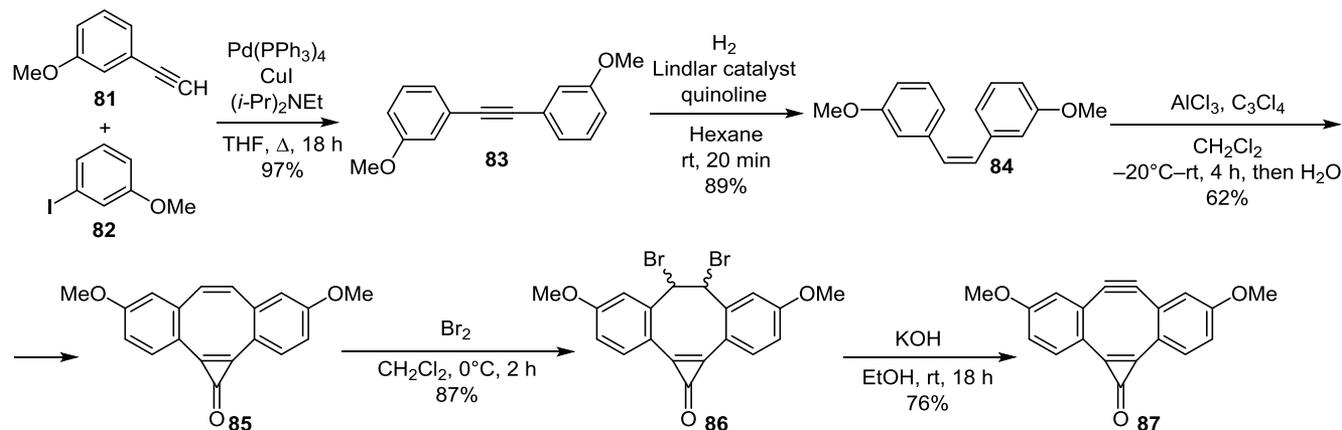
Дибензоциклооктинол **78** был использован в качестве исходного вещества для получения дибензоциклооктинов **79** и **80**, модифицированных по гидроксигруппе (схема 21).⁴³ Производные **79** и **80** были использованы для получения конъюгатов с гликопротеинами с целью выделения последних в виде комплексов с авидином. Были определены константы скорости реакции SPAAC полученных соединений, кото-

Схема 21. Получение производных дибензоциклооктинола **78**

рые составили k $0.057 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ (для соединения **78**), k $0.070 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ (для соединения **79**) и k $0.061 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ (для соединения **80**).

Эlegantный метод был применен для получения аннелированного с циклопропеном дибензоциклооктина **87** (схема 22).⁴⁴ Исходя из легкодоступных 1-этинил-3-метоксибензола (**81**) и 1-иод-3-метоксибензола (**82**) в результате реакции Соногаширы был получен 1,2-бис(3-метоксифенил)этин (**83**), который частичным восстановлением был превращен в алкен **84**. Алкилированием последнего по Фриделю–Крафтсу тетрахлорциклопропеном получили циклопропенон **85**. Его последующее бромирование привело к дибромиду **86**, дегидробромированием которого был получен целевой циклооктин **87**.

Аннелированный с циклопропеном дибензоциклооктин **87** способен давать флуоресцирующий продукт реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения (рис. 7). Использование такого реагента в экспериментах по внутриклеточной визуализации позволяет снизить риск искажения результатов конфокальной флуоресцентной микроскопии, поскольку исходные соединения не обладают флуоресценцией, а полезный сигнал дает только продукт реакции циклоприсоединения.

Схема 22. Получение аннелированного с циклопропеном дибензоциклооктина **87**

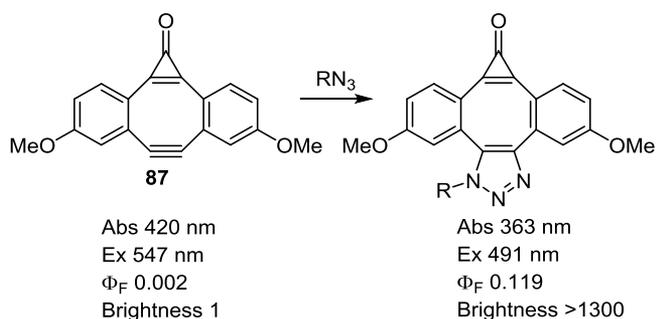


Рисунок 7. Азид-алкиновое [3+2]-циклоприсоединение между циклооктином **87** и органическим азидом, приводящее к флуоресцирующему продукту.

В модельной реакции с бензилазидом была определена константа скорости второго порядка азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения, которая для соединения **87** составила $0.019 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, что немного ниже значения для незамещенного дибензоциклооктина – $0.057 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; дополнительного напряжения в молекуле соединения **87** циклопропеновый фрагмент не создает.

2.4. Бицикло[6.1.0]нонины

Альтернативный путь повышения реакционной способности циклооктинов заключается в увеличении напряжения тройной связи, которое реализуется посредством ввода циклопропанового фрагмента с получением соответствующих бицикло[6.1.0]нонинов.

Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметанол **92** получен⁴⁵ (схема 23) из доступного 1,5-циклооктадиена (**88**). Достройку циклопропанового фрагмента осуществили с помощью реакции с диазоуксусным эфиром. Карбоксильная группа полученного соединения **89** была восстановлена до спиртовой. Дибромирование

Схема 23. Получение бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметанола **92**

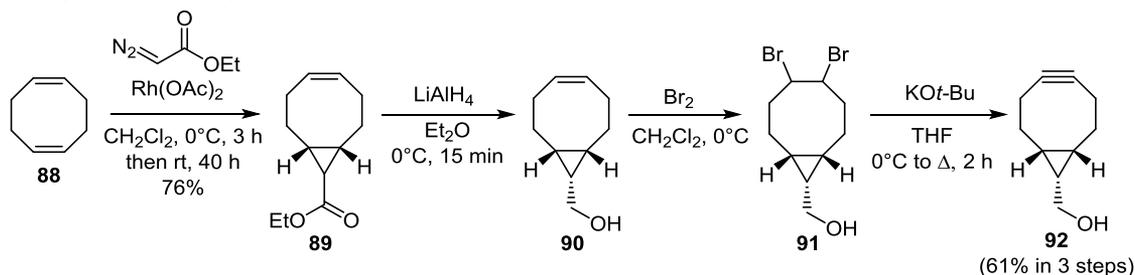


Схема 24. Получение 9-этинил-9-метилбицикло[6.1.0]нон-4-ина (**98**)

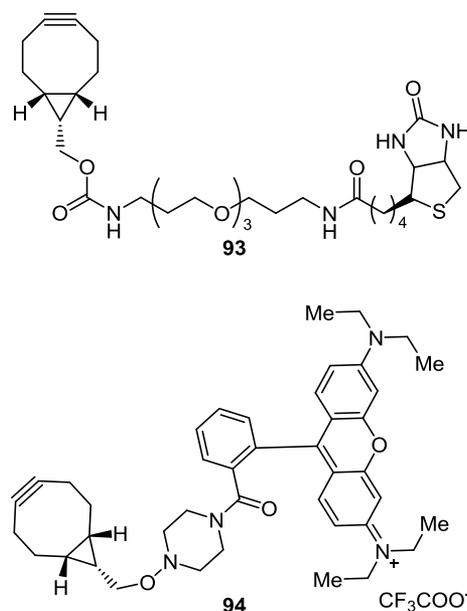
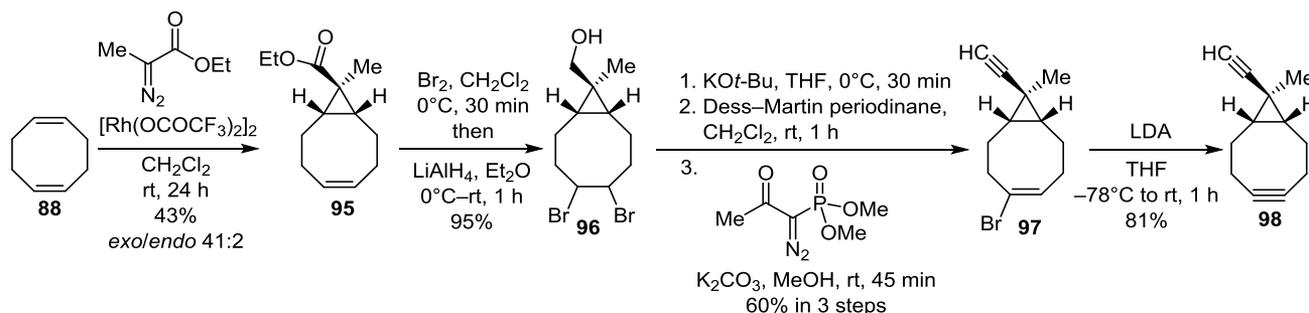


Рисунок 8. Модифицированные бицикло[6.1.0]нонины **93** и **94**.

спирта **90** привело в ключевому интермедиату **91**, из которого двойным элиминированием HBr был получен целевой продукт **92** с суммарным выходом 45%.

Гидроксигруппа соединения **92** была модифицирована биотином и производным флуоресцентного красителя Alexa Fluor 555 (рис. 8). Продемонстрирована возможность использования реакции SPAAC для продуктов такой модификации (соединений **93** и **94**) с целью внутриклеточной визуализации.

На схеме 24 представлен синтез 9-этинил-9-метилбицикло[6.1.0]нон-4-ина (**98**).⁴⁶ Катализируемое родием циклопропанирование 1,5-циклооктадиена (**88**) привело к получению производного *exo*-**95** с исключи-

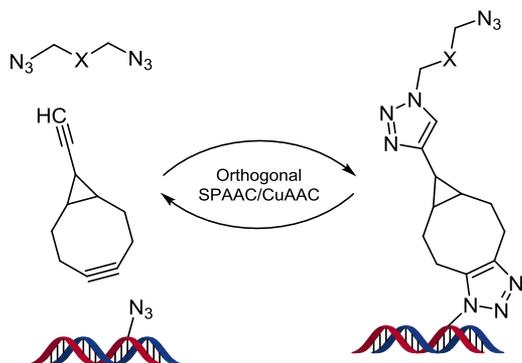


Рисунок 9. Последовательные ортогональные реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения для синтеза селективных кросс-сшивок.

тельной диастереоселективностью. Соединение **95** было последовательно подвергнуто бромированию и восстановлено с образованием дибрида **96**. Его частичное дегидробромирование под действием KOt - Vi давало циклооктен, в молекуле которого генерировали алкинильный фрагмент реакцией Охиры–Бестмана, получая интермедиат **97**. Последний превращали в целевой продукт **98** путем дегидробромирования с помощью LDA .

Такой тип бицикло[6.1.0]нонина, содержащий две алкиновые группы, которые обладают разной реакционной способностью в отношении азидов, позволяет проводить реакции SPAAC и CuAAC ортогонально, что может быть использовано для получения селективных кросс-сшивок (рис. 9).

2.5. Гетероциклические циклооктины

Дальнейшее развитие синтеза новых циклооктинов связано с получением гетероциклических циклооктинов. Основные структуры, синтезированные и исследованные на данный момент, представлены на рис. 10. Соединения **99–113** (производные азоцина), **114**, **115** (производные тиоцина) и **116** (производные оксоцина) далее для удобства будем называть аза-, тио- и оксациклооктинами соответственно.

В ходе систематического анализа влияния заместителей в молекулах дибензоаза-, тио- и оксациклооктинов **99–109** получены значения констант скорости реакции азид-алкинового циклоприсоединения и результаты квантово-химического моделирования с использованием теории функционала плотности.⁴⁷ Для исследованных дибензоциклооктинов **99–109** значения константы скорости реакции [3+2]-циклоприсоединения с участием бензилазида составили от $9 \cdot 10^{-4}$ до $1.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Наличие донорных заместителей или атомов фтора в *орто*-положении по отношению к тройной связи (соединения **101**, **103**, **108**) приводит к снижению константы скорости реакции SPAAC на 2-3 порядка.

Дибензоаза-, тио- и оксациклооктины используются для решения практических задач, связанных с селективной визуализацией молекул в живых клетках методами клик-химии. Детальный разбор методов синтеза наиболее важных дибензоаза-, тио- и оксациклооктинов приведен ниже.

Использование стратегии синтеза индолов по Фишеру привело к получению одного из первых

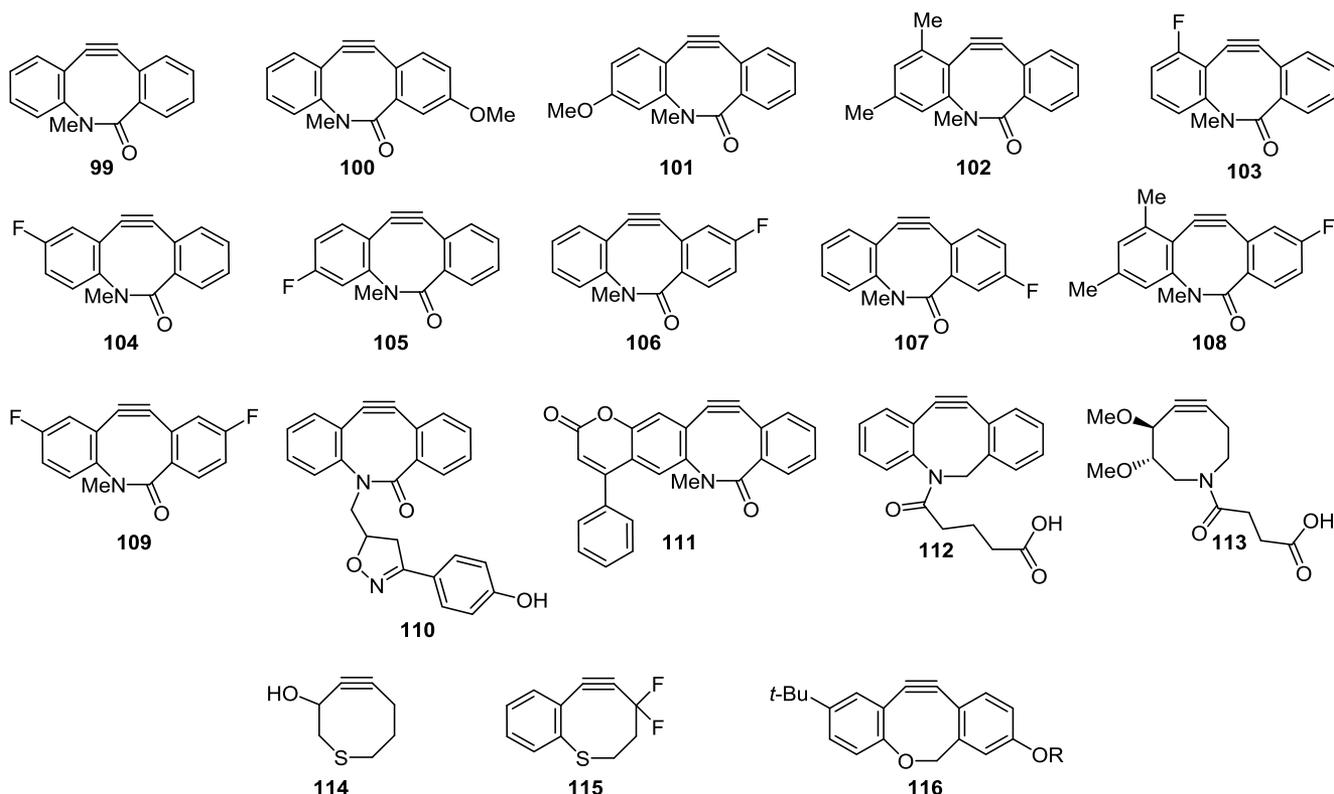
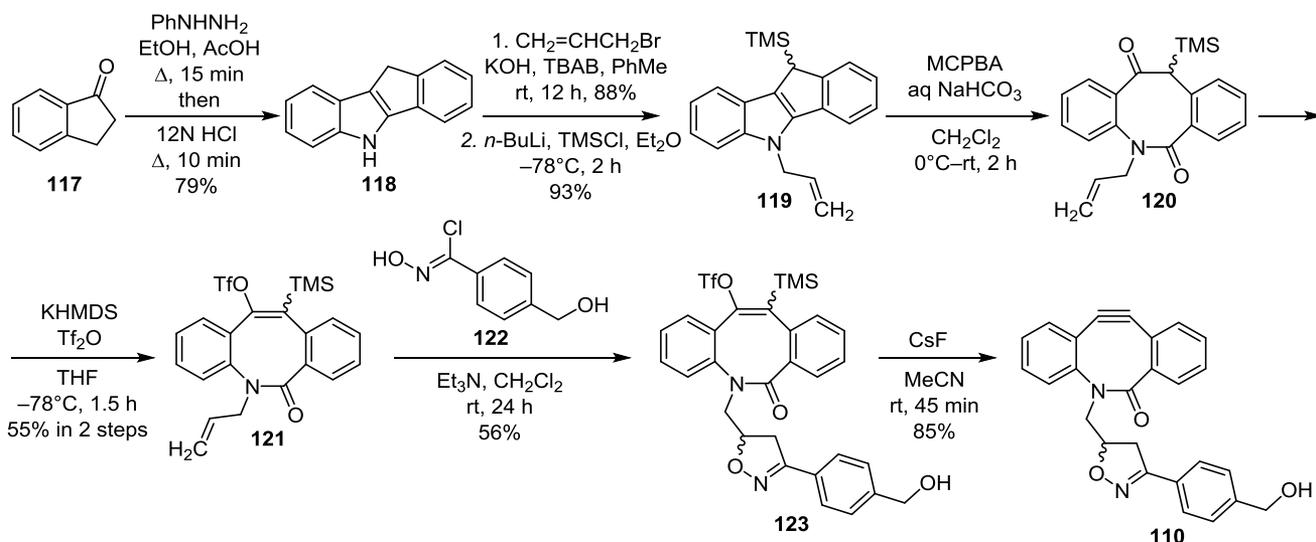


Рисунок 10. Гетероциклические циклооктины.

Схема 25. Получение дибензоазациклооктинона 110



дибензоазациклооктинонов **110** (схема 25).⁴⁸ Исходя из 2,3-дигидро-1*H*-инден-1-она (**117**) был получен 5,10-дигидроинден[1,2-*b*]индол (**118**). Последний алкилировали аллилбромидом в условиях межфазного катализа с целью дальнейшей функционализации, а также для защиты, после чего была введена триметилсилильная группа. Окисление полученного таким образом индола **119** избытком MCPBA привело к раскрытию центрального цикла и образованию кетоамида **120**. Обработка амида **120** KHMDS и Tf₂O позволили получить винилтрифлат **121**. Селективную модификацию терминального алкена **121** осуществили с помощью нитрилоксида (генерируемого из хлороксида **122** *in situ*), в результате чего был получен изоксазолин **123**. Эту процедуру провели с целью последующего использования нитрилоксидной периферии в качестве линкера для присоединения биотины или флуорофоров. Обработка винилтрифлата **123** фторидом цезия привела к целевому дибензоазациклооктинону **110**.

Соединение **110** исследовано в реакциях азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения с использованием бензилазида. Константа скорости реакции второго порядка составила 0.96 М⁻¹·с⁻¹, что в 12 раз выше, чем константа скорости аналогичной реакции с дифторциклооктином **46**, и в 450 раз выше по сравнению с неактивированным циклооктином.

Развивая идею синтеза флуорогенных реагентов для реакций SPAAC, группа Бертоцци получила дибензоазациклооктинон, конденсированный с гетероциклической системой кумарина (coumBARAC) **111** (схема 26).¹³ Инденоиндол **124**⁴⁹ силилировали с помощью триметилсилилхлорида, получая инденоиндол **125**. Его конденсация с этилбензоилацетатом в присутствии трифторметансульфокислоты позволила получить ключевой интермедиат **126**, к которому применили стратегию, аналогичную используемой в синтезе азациклооктина **110**. Промежуточное соединение **126** окислили в присутствии избытка MCPBA и получили амид **127**, который был последовательно превращен в винилтрифлат **128** и, далее, в тетрациклический дибензоазациклооктинон **111**.

У продукта реакции соединения **111** с 2-азидоэтанолом – большой Стоксов сдвиг, λ_{ex} 305 нм, λ_{em} 438 нм, что снижает вероятность искажения результатов в случае использования этого реагента для наблюдения за клеточными процессами методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Дибензоазациклооктин **112** получен по оригинальному синтетическому пути (схема 27).⁵⁰ На первой стадии синтеза с количественным выходом был получен продукт реакции кросс-сочетания Соногаширы 2-этиниланилина и (2-иодфенил)метанола,

Схема 26. Получение coumBARAC 111

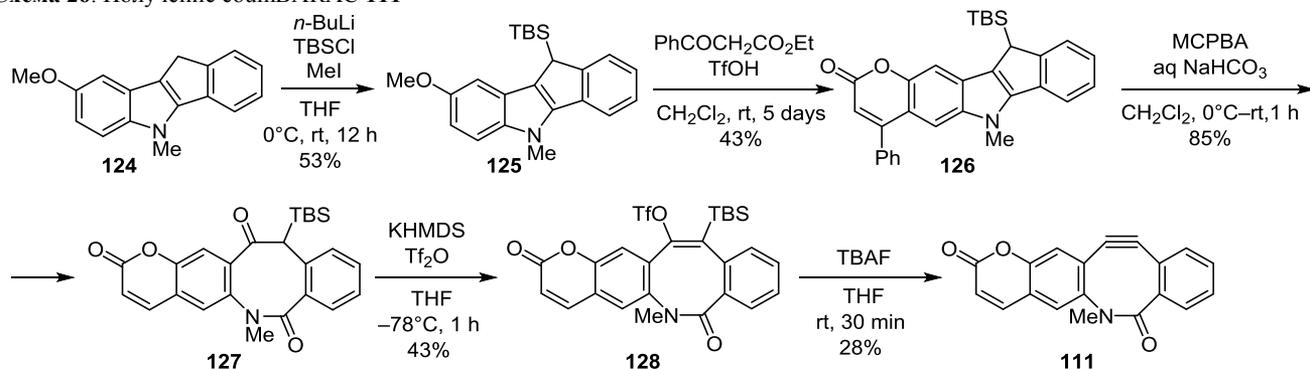
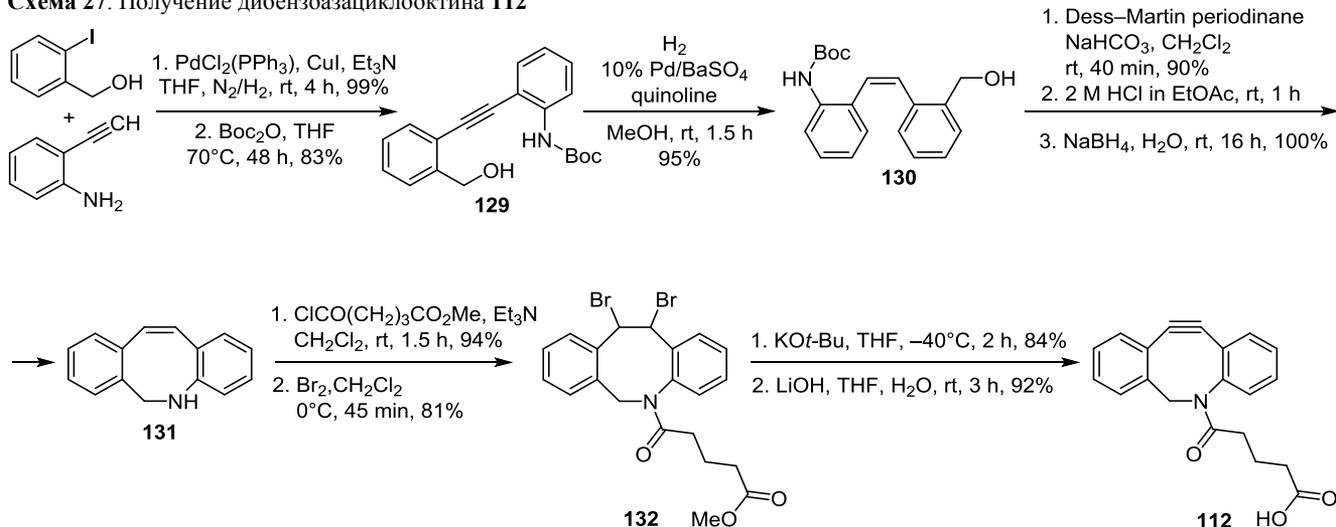


Схема 27. Получение дибензоазациклооктина 112



аминогруппа которого была подвернута Вос-защите с образованием соединения **129**. Частичное восстановление тройной связи привело к образованию *Z*-алкена **130**, гидроксигруппа которого была окислена до альдегидной под действием периодата Десса–Мартина. Удаление Вос-защиты привело к немедленному образованию циклического имина, который без выделения восстанавливали NaBH_4 и получали свободный вторичный амин **131**. Общий выход ключевого дибензоазациклооктена **131** в пяти стадиях составил 70%. Далее атом азота соединения **131** был проацилирован, после чего было проведено бромирование (соединение **132**) и дегидробромирование, в результате чего был получен дибензоазациклооктин с защищенной аминогруппой. Удаление метилового эфира привело к целевому дибензоазациклооктину **112**.

Кинетика реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения дибензоазациклооктинона **112** с бензилазидом изучалась в дейтерированном метаноле, константа скорости составила k $0.29 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Новый

реагент обладал лучшими реакционными свойствами, чем дибензоциклооктинол **78** (k $0.057 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) и дифторциклооктин **46** (k $0.076 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

Один из представителей азациклооктинов, не содержащих конденсированных ароматических циклов, – 6,7-диметоксиазациклоокт-4-ин **113** – получен в соответствии со схемой 28.⁵¹ Исходный 6-бромглюкопиранозид **133**⁵² превращали в ациклический диен **134**, циклизация которого при использовании катализаторов Граббса приводила к образованию азациклооктена **135**. Гидроксигруппа соединения **135** была окислена до карбонильной, последующее восстановление двойной связи $\text{C}=\text{C}$ привело к кетону **136**. Азациклооктанон **136** под действием семикарбазида и оксида селена превратили в селенодиазол **137**, термическое разложение которого привело к целевому продукту **113**.

Реакционная способность полученного соединения **113** была исследована в модельной реакции с участием бензилазида: константа скорости реакции второго порядка ($3.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) оказалась гораздо ниже, чем

Схема 28. Получение диметоксиазациклооктина 113

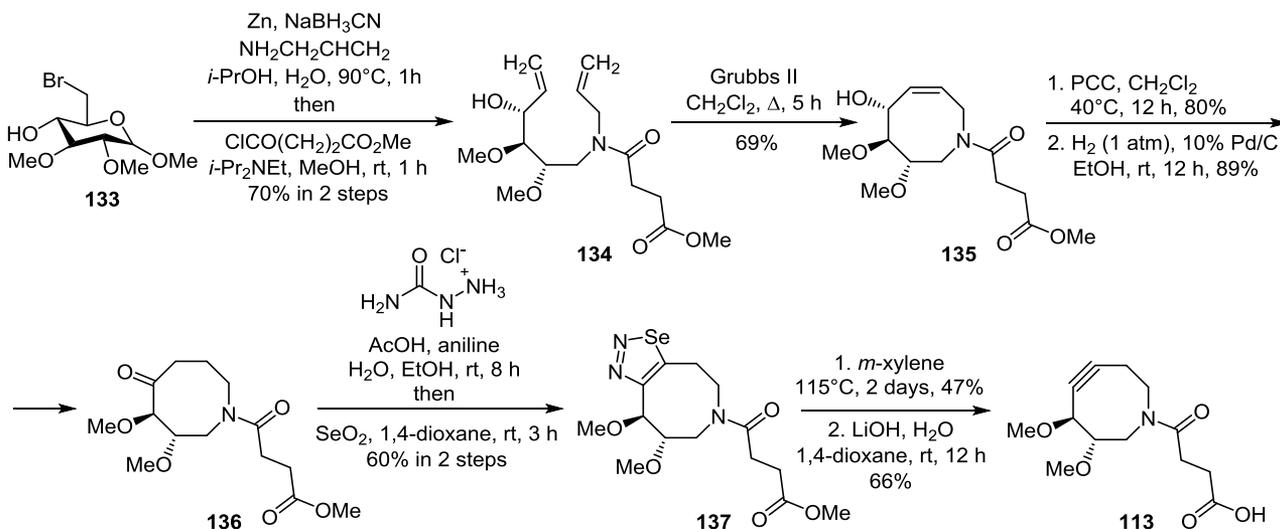
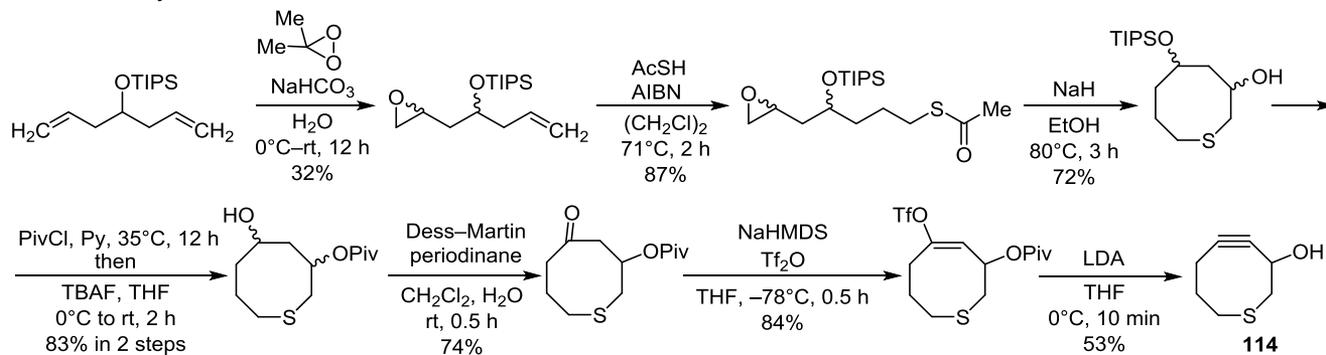
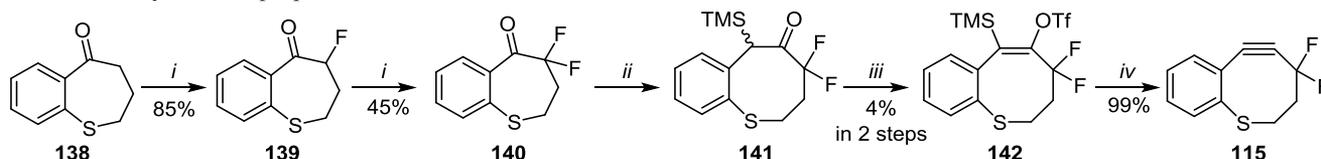


Схема 29. Получение тиациклоокт-4-ин-2-ола **114**Схема 30. Получение дифторбензотиациклооктина **115**

i: LDA, *N*-фторбензолсульфонимид, THF, -78 to 0°C , 1 h; *ii*: AlMe_3 , TMSCHN_2 , CH_2Cl_2 , 0°C to rt, 10 min; *iii*: NaHMDS , Tf_2O , THF, -78°C , 2 h; *iv*: CsF_2 , MeCN, rt, 1 h

для реакций с дибензоциклооктином **78** или дифторциклооктином **46**, и была близка к константе скорости реакции с незамещенным циклооктином. Из полезных свойств нового субстрата для клик-химии стоит отметить высокую полярность и гидрофильность, что снижает вероятность неспецифического связывания с белками и клетками и повышает чувствительность в отношении клеток, помеченных азидными группами. Синтетическая процедура может быть адаптирована к различным исходным углеводам.

Для проверки влияния акцепторных гетероатомов на реакционную способность циклооктинов в азид-алкиновом [3+2]-циклоприсоединении был получен тиациклоокт-4-ин-3-ол (**114**) (схема 29).⁵³

Исследование кинетики модельной реакции азид-алкинового циклоприсоединения между тиациклооктинами и бензилазидом показало, что значение константы скорости составило $3.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Атом серы снижает напряжение цикла циклооктина, что приводит к понижению реакционной способности.

Исходя из снижения реакционной способности в случае соединения **114**, было сделано предположение, что дифтордибензоциклооктин **115** будет обладать достаточной стабильностью и не давать продуктов димеризации, в отличие от бензодифторциклооктина **42**. Для проверки этой гипотезы был осуществлен синтез соединения **115** в соответствии со схемой 30.⁵³

Исходный 3,4-дигидробензо[*b*]тиепин-5(2*H*)-он (**138**) превратили под действием LDA и *N*-фторбензолсульфонимида сначала в монофторпроизводное **139**, а затем в дифторпроизводное **140**. Интермедиат **141** был получен действием на соединение **140** AlMe_3 и TMSCHN_2 . α -Силилкетон **141** немедленно превращали в винилтрифлат **142**. Действием на последний фторида цезия был получен целевой 4,4-дифтордибензоциклоокт-5-ин **115**. Циклооктин **115** исследовали в

модельной реакции с бензилазидом, константа скорости второго порядка для этой реакции составила $0.015 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Вызывает интерес работа, посвященная синтезу и исследованию дибензоциклооктинов **116a–c**.⁵⁴ Оригинальный двухстадийный метод их получения (схема 31) предполагает использование коммерчески доступных исходных соединений и фотохимический процесс на завершающей стадии синтеза. На первой стадии происходит катализируемая триметиалюминием конденсация исходного эфира с тетрахлорциклопропеном с образованием циклопропенонов **143**. Последние под действием ультрафиолетового излучения с длиной волны 350 нм теряют молекулу монооксида углерода, образуя целевые дибензооксициклооктины **116a–c**.

Соединения **116a–c** обладают высокой реакционной способностью в азид-алкиновом циклоприсоединении, значения константы скорости реакции для различных субстратов составили $8\text{--}50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, с учетом легкости получения соединения **116a–c** – одни из самых удачных циклооктинов для клик-химии.

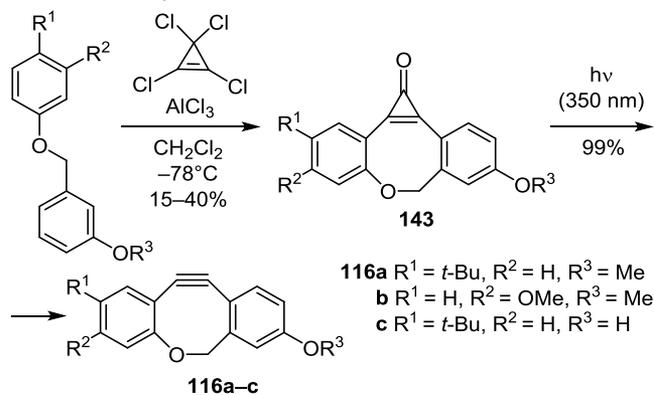
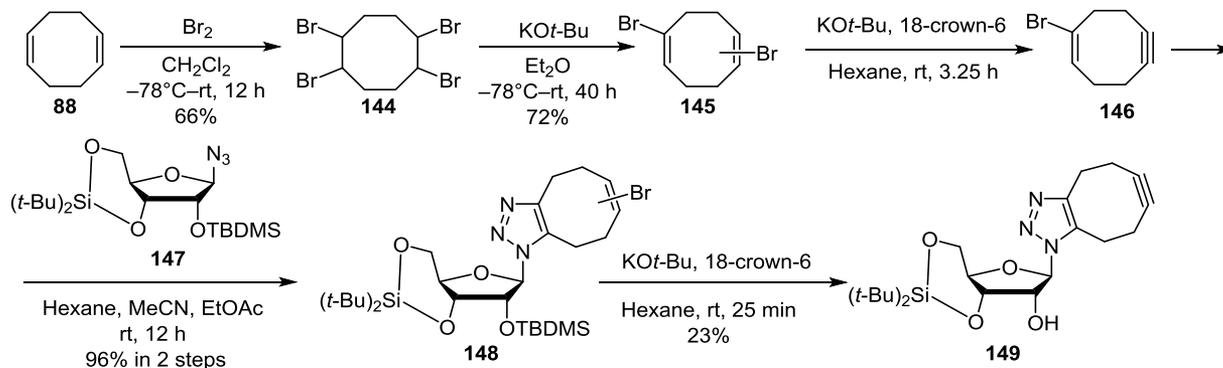
Схема 31. Получение дибензооксициклооктинов **116a–c**

Схема 32. Получение циклооктина **149**, конденсированного с триазольным циклом и содержащего фрагмент рибозы

2.6. Другие типы циклооктинов

Ниже рассмотрены другие соединения, содержащие циклооктиновый фрагмент и вызывающие как синтетический, так и практический интерес.

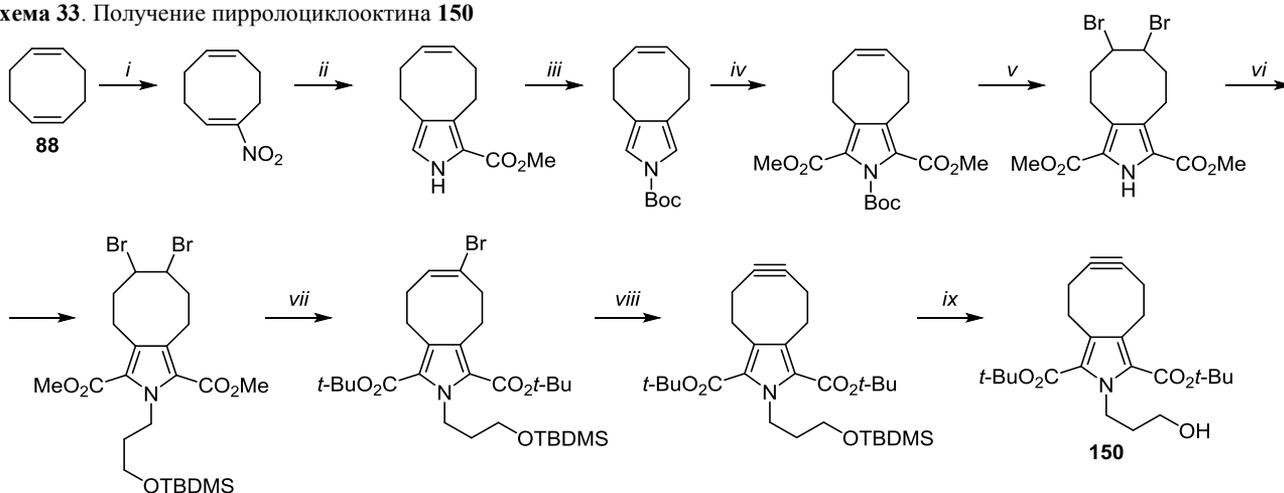
Получены соединения, содержащие фрагменты циклооктина и рибозы, например соединение **149**. Этот тип соединений использовался для доставки циклооктинового реакционного центра в молекулы синтетических нуклеиновых кислот.⁵⁵ Стратегия синтеза рибозилтриазолсодержащих циклооктинов представлена на схеме 32. Циклооктандиен (**88**) был подвергнут исчерпывающему бромированию с образованием 1,2,5,6-тетрабромциклооктана (**144**), частичное дегидробромирование которого привело к дибромциклоокта-1,5-диену **145** в виде смеси изомеров. Дегидробромирование соединения **145** позволило получить 1-бромциклоокт-1-ен-5-ин **146**, реакция которого с модифицированной рибозой **147**, содержащей азидную группу, привела к образованию соединения **148**. Дегидробромирование соединения **148** дало целевой продукт **149**.

Из циклооктинов, конденсированных с другими гетероциклами, следует отметить пирролоциклооктин **150**, синтез которого иллюстрирует схема 33.⁵⁶

В экспериментах по изучению кинетики реакции соединения **150** с бензилазидом в CD_3CN было установлено, что константа скорости второго порядка равна $0.060 \pm 0.004 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Данное значение находится между значениями для соединений **78** ($k 0.057 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) и **46** ($k 0.076 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$).

Предложен простой и элегантный способ синтеза бензоциклооктина **151** (схема 34).⁵⁷ Константа скорости второго порядка реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения для бензоциклооктина **151** была определена в модельной реакции с бензилазидом и составила $0.24 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. На основе циклооктина **151** было получено производное **152**, содержащее фрагмент флуоресцина. Соединение **152** использовали как реагент для внутриклеточной визуализации азидогликанов.

Для реализации ортогональной стратегии SPAAC/CuAAC был синтезирован 5-метил-5-этинилциклоокт-1-ин **153** (схема 35).⁴⁶

Схема 33. Получение пирролоциклооктина **150**

i: $AgNO_2$, TEMPO, $CHCl_3$, $70^\circ C$, 12 h (35%); *ii*: EtO_2CCH_2NC , DBU, THF, Δ , 15 h (86%)

iii: a) NaOH, ethylene glycol, $195^\circ C$, 45 min; b) NEt_3 , DMAP, Boc₂O, THF, rt, 18 h (93% in 2 steps)

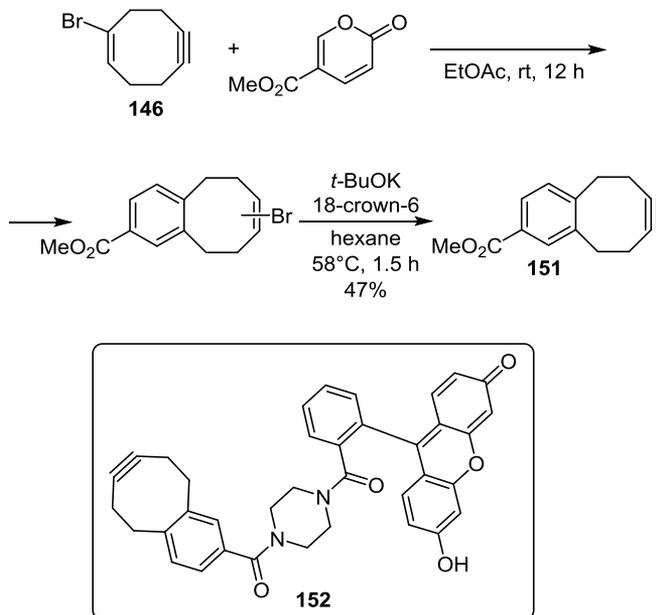
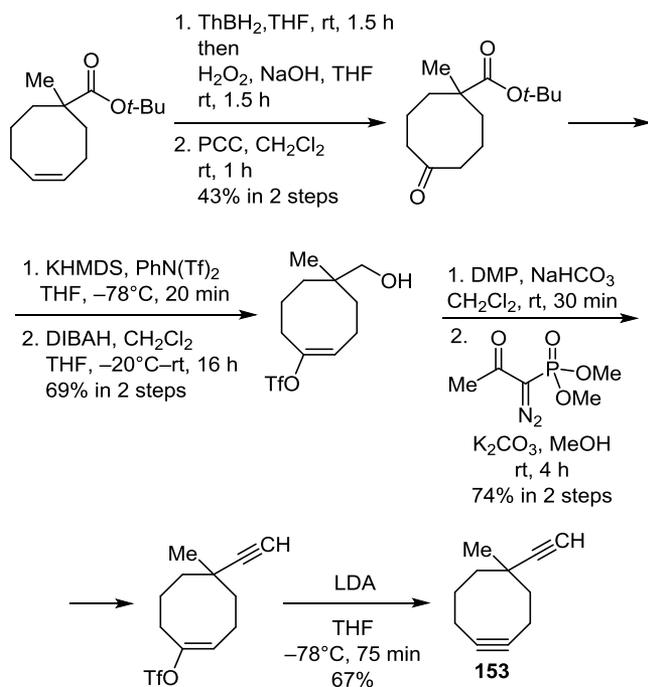
iv: a) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine, *n*-BuLi, THF, $-78^\circ C$, 3 h; b) $ClCO_2Me$, THF, $-78^\circ C$, 3 h (75% in 2 steps)

v: a) Br_2 , DCM, $-78^\circ C$ –rt, 30 min; b) TFA, DCM, rt, 30 min (97%)

vi: $I(CH_2)_3OTBDMS$, DMF, $80^\circ C$, 1 h (56%)

vii: 1M KOt-Bu in THF, Et_2O , -10 – $10^\circ C$, 1.5 h (66%); *viii*: KOt-Bu, 18-crown-6, hexane, $55^\circ C$, 45 min (71%)

ix: 1M TBAF, THF, rt, 4 h (62%)

Схема 34. Получение монобензоциклооктина **151** и структура его производного **152**, содержащего флуоресцинСхема 35. Получение 5-метил-5-этинилциклоокт-1-ина **153**

Циклооктин **153** был успешно использован, по аналогии с соединением **98**, для получения кросс-сшивок между различными типами полисахаридов, несущих азидные группы.

На сегодняшний день стратегия клик-химии является важным инструментом для получения биоконъюгатов различных молекул. Реакция азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения, промотируемая напряжением цикла (SPAAC), с участием циклооктина и органического

азиды впервые была использована как инструмент для внутриклеточной визуализации в 2004 г. Количество разнообразных циклооктинов для реакции SPAAC насчитывает свыше 60 структур. Среди них наиболее востребованы 4-[(2,2-дифторциклоокт-3-ин-1-ил)метил]-бензойная кислота (k 0.076 $M^{-1}\cdot c^{-1}$), 5-[[3-(4-гидрокси-фенил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-ил]метил]-11,12-дидегидробензо[*b,f*]азаоцин-6(5*H*)-он (k 0.96 $M^{-1}\cdot c^{-1}$) и мидифицированные бицикло[6.1.0]нонины (k 0.29 $M^{-1}\cdot c^{-1}$), поскольку эти соединения обладают высокой реакционной способностью для реакций SPAAC и оптимальной стабильностью, а также содержат необходимые заместители для выполнения требуемых функций (флуоресценция, образование селективных кросс-сшивок и др.). Этот факт говорит о важности развития новых синтетических подходов (в том числе с позиций комбинаторной химии) для расширения структурного разнообразия циклооктинов и настройки их фотофизических и кинетических характеристик с целью получения молекул с заданными свойствами.

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант 17-33-50091).

Список литературы

1. Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1893**, 48, 94.
2. Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1963**, 2, 565.
3. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
4. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
5. Singh, M. S.; Chowdhury, S.; Koley, S. *Tetrahedron* **2016**, 72, 5257.
6. (a) Horisawa, K. *Front. Physiol.* **2014**, 5, 1. (b) Ishizuka, T.; Liu, H. S.; Ito, K.; Xu, Y. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1.
7. (a) Jao, C. Y.; Salic, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 15779. (b) Salic, A.; Mitchison, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 2415.
8. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, 287, 2007.
9. Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260.
10. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046.
11. Chang, P. V.; Bertozzi, C. R. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8864.
12. Möller, H.; Böhrsch, V.; Bentrop, J.; Bender, J.; Hinderlich, S.; Hackenberger, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 5986.
13. Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2011**, 13, 5937.
14. Horner, K. A.; Valette, N. M.; Webb, M. E. *Chem.–Eur. J.* **2015**, 21, 14376.
15. Wang, D.; Viennois, E.; Ji, K.; Damera, K.; Draganov, A.; Zheng, Y.; Dai, C.; Merlin, D.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 15890.
16. Agarwal, P.; Beahm, B. J.; Shieh, P.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 11504.
17. Singh, I.; Heaney, F. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2706.
18. Qian, L.; Zhang, C.-J.; Wu, J.; Yao, S. Q. *Chem.–Eur. J.* **2017**, 23, 360.
19. (a) Kirmse, W.; Horner, L. *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, 1, 614. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057. (c) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrel, D. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 19. (d) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J. A. N.; Dirks, T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 805.

20. Meier, H.; Petersen, H.; Kolshorn, H. *Chem. Ber.* **1980**, 113, 2398.
21. Turner, R.; Jarrett, A. D.; Goebel, P.; Mallon, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 790.
22. Shea, K. J.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4846.
23. Sanders, B. C.; Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Arumugam, S.; Guo, J.; Boltje, T. J.; Popik, V. V.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 949.
24. Sauer, J.; Heldmann, D. K.; Hetzenegger, J.; Krauthan, J.; Sichert, H.; Schuster, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 12, 2885.
25. Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1736.
26. Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wießler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. *ChemBioChem* **2012**, 13, 2094.
27. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 666.
28. Reese, B.; Shaw, A. *J. Chem. Soc. D* **1970**, 1172.
29. Bistrup, A.; Bhakta, S.; Lee, J. K.; Belov, Y. Y.; Gunn, M. D.; Zuo, F.-R.; Huang, C.-C.; Kannagi, R.; Rosen, S. D.; Hemmerich, S. *J. Cell Biol.* **1999**, 145, 899.
30. Luchansky, S. J.; Argade, S.; Hayes, B. K.; Bertozzi, C. R. *Biochemistry* **2004**, 43, 12358.
31. Hagendorrn, T.; Bräse, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 6, 1280.
32. Banert, K.; Plefka, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 6171.
33. Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo A.; Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 644.
34. Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272.
35. Kostova, V.; Dransart, E.; Azoulay, M.; Brulle, L.; Bai, S.-K.; Florent, J.-C.; Johannes, L.; Schmidt, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 7150.
36. Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11799.
37. Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11486.
38. Pirrung, M. C.; Webster, N. J. G. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3603.
39. Banks, R. E.; Lawrence, N. J.; Popplewell, A. L. *Chem. Commun.* **1994**, 343.
40. Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 16793.
41. Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 2253.
42. Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1984.
43. Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *ChemBioChem* **2011**, 12, 1912.
44. Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 18809.
45. Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; van Delft, F. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 9422.
46. Munster, N.; Nikodemiak, P.; Koert, U. *Org. Lett.* **2016**, 18, 4296.
47. Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9199.
48. Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3688.
49. Brown, D. W.; Graupner, P. R.; Sainsbury, M.; Shertzer, H. G. *Tetrahedron* **1991**, 47, 4383.
50. Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 97.
51. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097.
52. Jones, K.; Wood, W. W. *Carbohydr. Res.* **1986**, 155, 217.
53. de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 2443.
54. Mcnitt, C. D.; Popik, V. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 8200.
55. van Delft, P.; de Witte, W.; Meeuwenoord, N. J.; van Der Heden van Noort, G. J.; Versluis, F.; Olsthoorn, R. C. L.; Overkleef, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 34, 7566.
56. Gröst, C.; Berg, T. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 3866.
57. Varga, B. R.; Kállay, M.; Hegyi, K.; Béni, S.; Kele, P. *Chem.–Eur. J.* **2012**, 18, 822.