

Epäorgaaninen napsautusreaktio (iClick) ja sen käyttö biokonjugointimenetelmänä

Bio-orgaaninen kemia
Kemian laitos, Turun yliopisto
LuK-tutkielma
6 op

Aleksandra Morozova

29.05.2025
Turku
LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Aleksandra Morozova

Otsikko: Epäorgaaninen napsautusreaktio (iClick) ja sen käyttö biokonjugointimenetelmänä

Ohjaaja(t): Tuomas Lönnberg

Sivumäärä: 13

Päivämäärä: 29.05.2025

Napsautusreaktiot ovat bio-ortogonaalisia kemiallisia reaktioita, jotka ovat tunnettuja niiden nopeudesta, korkeasta saannosta sekä helppokäyttöisyydestä. Näiden monipuolisten ominaisuuksien ansiosta niille on löydetty käyttöä monella tieteellä. Napsautusreaktioiden poikkeuksellisen nopeuden ja selektiivisyyden ansiosta on jopa onnistettu leimaamaan biomolekyylejä. Kuitenkin niiden epäorgaanista vastinetta on tutkittu huomattavasti vähemmän, vaikka se tarjoaa lupaavan vaihtoehdon orgaanisille luminoiville leimoille.

Epäorgaaninen napsautusreaktio esiteltiin nimeltään ensimmäisen kerran Viegon tutkimuksessa vuonna 2011. Tässä tutkimustyössä hänen onnistui suorittaa 1,3 – dipolaarisen sykloadditioreaktio, mutta käyttäen lähtöaineina metalliatsidi -ja metalliasetylidihdisteitä. Hänen tutkimuksensa pohjalta syntyi tutkimussuunta, joka keskittyi erilaisten organometallikompleksien synteisiin. Kyseiset metallikompleksit keskittyvät erilaisiin metallien ominaisuuksien ja niihin sijoittuviin ligandien sovelluksiin, joita voidaan käyttää erilaisiin biokonjugointimenetelmiin. Epäorgaanisen napsautusreaktion avulla ligandien asettaminen onnistuu helposti ja nopeasti huoneen lämpötilassa.

Avainsanat: bio-ortogonaalinen, napsautusreaktio, epäorgaaninen napsautusreaktio, metallikompleksi

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Bio-ortogonaalinen kemia napsautusreaktioiden pohjana.....	2
	2.1 Staudingerin ligaatio.....	2
	2.2 Orgaaniset napsautusreaktiot.....	3
3	Epäorgaaninen napsautusreaktio.....	4
	3.1 Napsautusreaktioiden kultainen kausi.....	5
	3.2 Iridium(III) -kompleksi.....	5
	3.3 Platina(II) -kompleksi.....	6
4	Biokonjugointimenetelmät.....	7
	4.1 Yleisesti fluoresenssilla leimatuista proteiineista <i>in vivo</i>	7
	4.2 Organometallikompleksileimat.....	7
5	Johtopäätökset ja yhteenveto.....	8
	Lähteet.....	9

AFP

CuAAC

MTT

SPAAC

POI

Autofluoresoivan proteiinin fuusio

Kuparikatalysoitu atsidi-alkyyni sykloadditio

Varjoaineen kudoksen läpikulkuun kuluva aika

Rengasjännityksen ajama atsidi-alkyyni sykloadditio

Kiinnostuksen kohteena oleva proteiini

1. Johdanto

Napsautusreaktiot tunnetaan niiden nopeasta reaktioajasta, kyvystä muodostaa stabiileja lopputuotteita sekä suhteellisen korkeasta saannosta alhaisissakin pitoisuuksissa. Jotta ne eivät häiritse luonnollisia prosesseja, reaktion on suoriutuva isännän fysiologisessa pH:ssa ja lämpötilassa eli bio-ortogonaalisesti. Reaktioihin ei saa vaikuttaa vesi, hapettimet tai muut biologisessa ympäristössä esiintyvät kemialliset tekijät. Napsautusreaktioiden selektiivisyys perustuu funktionaalisiin ryhmiin, jotka eivät esiinny luonnostaan biologisissa järjestelmissä. Tällä taataan, että reaktio kohdistuu suunniteltuun biomolekyyliin.¹ Kyseisellä kohdennetulla lähestymistavalla on monia käyttökohteita kuten isotooppilääketieteessä, syöpälääkehoitojen kohdentamisessa tai soluprosessien minuuttitarkassa analytiikassa.²⁻⁴

Vaikka orgaanisten napsautusreaktioiden käyttö on monipuolista ja se laajenee jatkuvasti, on niiden epäorgaanista vastinetta tutkittu huomattavasti vähemmän. Epäorgaaninen napsautusreaktio esiteltiin nimellään ensimmäisen kerran Viegon tutkimustyössä. Viego pyrki saavuttamaan samankaltaisia tuloksia kuin 1,3-dipolaarisessa Huisgenin sykloadditiossa alkyynin ja atsidin välillä. Hän käytti reaktiossaan kulta-atsidi ja kulta-asetylidihydrideitä, sillä kulta kykeni imitoimaan Huisgenin sykloaddition ominaisuuksia. Tästä eteenpäin epäorgaaniset napsautusreaktiot alkoivat kehittyä kohti metalliatsidikomplekseja. Organometallikompleksien synteesiin käytettiin sellaisia metalleja kuten iridium, palladium, nikkeli, kulta ja platina.^{5,6}

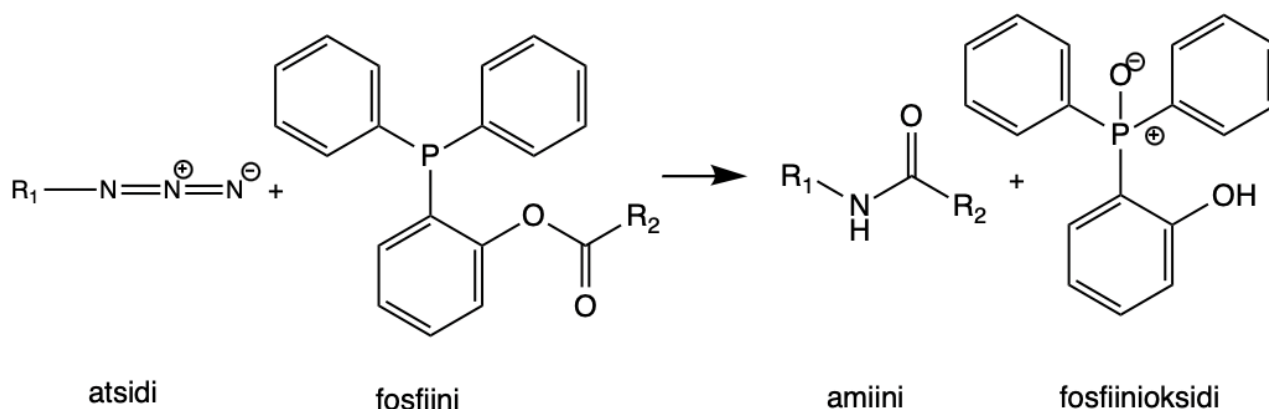
Viegon epäorgaanisen napsautusreaktion perustuvat jatkotutkimukset osoittavat, että metallikomplekseihin voi liittää erilaisia alkyynejä ja alkynoneja tulevaa funktionalisointia varten. Esimerkiksi biotiinia tai koliinihappoa voi käyttää biologisina kantajina. Samalla metallikompleksit kykenevät pysyä ortogonaalisina luminoivina koettimina biologisessa järjestelmässä, jossa ne ovat vain vähän sytotoksisia nisäkäsoluja kohtaan. Epäorgaaniseen napsautusreaktion perustuvat synteesit ovat suhteellisen suoraviivaisia ja saannot korkeita.^{4,7}

2 Bio-ortogonaalinen kemia napsautusreaktioiden pohjana

2.1 Staudingerin ligaatio

Ortogonaalisuus on matemaattinen käsite, joka kuvaa kahta toisistaan riippumattomasti vaihtelevaa ryhmää, ja tästä käsitteestä bio-ortogonaaliset reaktiot saivat nimensä. Reaktio etenee biologisessa ympäristössä häiritsemättä elävän organismin biokemiallisia prosesseja. Ensimmäinen bio-ortogonaalinen reaktio, joka suoritettiin elävässä organismissa, on Staudingerin ligaatio. Staudingerin ligaatio kehitettiin muunnoksena Staudingerin reaktioista. Alkuperäisessä reaktiossa atsidi ja fosfiini reagoivat tuottaen iminofosforaaniväliuotteen kautta amiinin ja fosfiinioksidin (kaavio 1).^{1,8,9} Reaktiota täydennettiin lisäämällä elektrofiilinen loukku eli esteri. Lisäyksen ansiosta iminofosforaani reagoi esterin kanssa ja muodostaa yksinkertaisen amidisidoksen, joka yhdistää kaksi reagoivaa lähtöainetta.^{1,8} Staudingerin ligaatiolla on erottelva ominaisuus, koska atsidit reagoivat selektiivisesti fosfiinien kanssa.

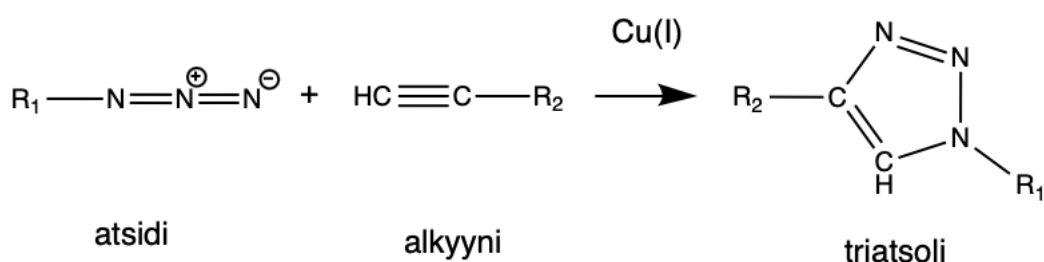
Funktionaalisenä ryhmänä atsidit ovat pieniä ja biologisesti yhteensopivia, joten niillä on helppoa leimata biomolekyylejä. Menetelmä toteutetaan kahdessa vaiheessa: linkkerin kiinnittäminen biomolekyyliin ja koettimen kiinnittäminen biomolekyyliin linkkerin välityksellä. Näin on mahdollista tutkia ja muokata biomolekyylejä *in vivo*. Viimeisen kahden vuosikymmenen aikana bio-ortogonaalisesta kemiasta on tullut yksi tärkeimmistä menetelmistä biologisen tutkimuksen alalla.¹ Staudingerin ligaation hitaus ja siitä johtuva puutteellinen leimaaminen kuitenkin rajoittavat sen käyttöä nopeissa biologisissa prosesseissa. Staudingerin ligaatiota korvataan aktiivisesti nopeammilla ligaatioreaktioilla.¹



Kaavio 1. Esimerkki Staudingerin ligaatiosta, jonka tuotteena on amiini ja fosfiinisivutuote.

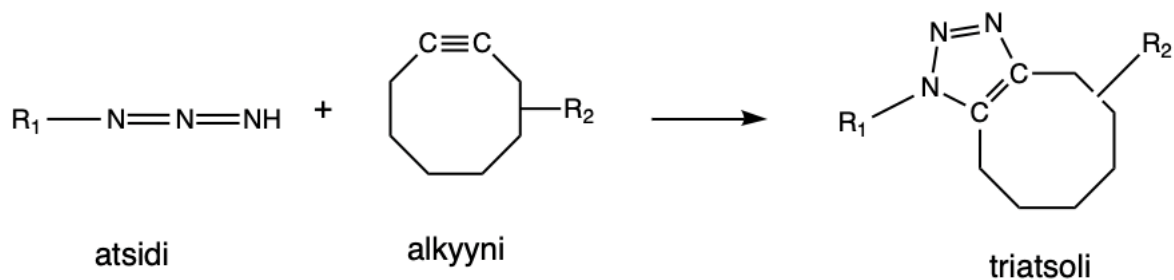
2.2 Orgaaniset napsautusreaktiot

1,2,3-triatsolin synteesi atsidista ja terminaalista alkyynista vaatii 1,3-dipolaarisen sykloadditioreaktion, joka on joustavin kaikista napsautusreaktioista. Kyseinen reaktio vaatii suuren määrän energiaa alkyynien sidoskulman muuttamiseksi ja triatsolin muodostamiseksi. Tämän ongelman ratkaisemiseksi kehitettiin Cu(I)-katalysoitu versio reaktiosta.⁸ CuAAC (kuparikatalysoitu atside-alkyyni sykloadditio) käyttää Cu(I):ia katalyyttinä nopeuttaakseen reaktiota. Muodostuva triatsolirengas yhdistää lähtöainemolekyylit toisiinsa. Lopputuote on rakenteellisesti puhdas ja korkeamolekyylipainoinen triatsoli (kaavio 2).⁸ Kupari kykenee pysymään vakaana katalyyttinä eri reaktio-olosuhteissa kuten hapettumisessa, pelkistymisessä tai hydrolyysissä. Näiden ominaisuuksien perusteella kehitettiin useita kuparipohjaisia katalyyttejä synteisiä ja jälkifunktionalisointia varten. Koska biologisissa järjestelmissä ei luonnostaan esiinny atsideja tai alkyynejä, CuAAC toimii selektiivisenä alustana biomolekyylien muokkaamiseen ja tutkimiseen. Toisaalta CuAAC:ssa käytetty Cu(I) aiheuttaa oksidatiivisia vaurioita soluille, mikä rajoittaa sen käyttöä elävissä soluissa^{1,8,9}.



Kaavio 2. Esimerkki atsidin ja alkyynin välisestä sykloadditioreaktiosta, joka käyttää kupari(I):ä katalyyttinä

Etsittäessä vaihtoehtoa sytotoksiselle kuparikatalyytille havaittiin, että alkyynin pakottaminen rengasrakenteeseen voi käynnistää reaktion atsidien ja alkyynien kesken, jolloin tarve katalyytille poistuu kokonaan. Reaktion kupariton versio perustuu rengasjännityksen ajamaan atside-alkyyni sykloadditioreaktioon (SPAAC), joka tapahtuu atsidin ja syklo-oktyynin välillä (kaavio 3).^{1,8}

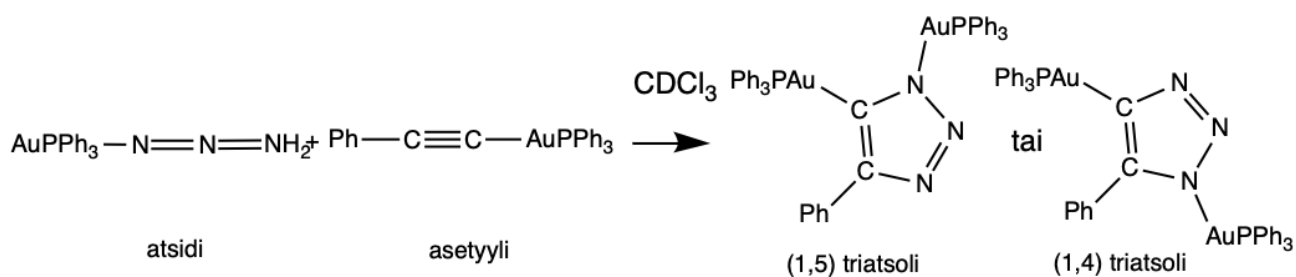


Kaavio 3. Esimerkki atsidin ja alkyynin välisestä sykloadditioreaktiosta, joka perustuu rengasjännitykseen.

3 Epäorgaaninen napsautusreaktio

3.1 Napsautusreaktioiden kultainen kausi

Ensimmäinen esimerkki organometallikemian käytöstä yhdistettynä napsautusreaktioon oli reaktio metalliatsidien ja metalliasetylidien välillä. Reaktiossa käytettiin trifenyylifosfiinikulta(I)atsidia ja trifenyylifosfiinikulta(I)fenyyliasetyliä ja lopputuotteena saatiin 4-fenyyli-1,5-bis-trifenyylifosfiinikulta(I)-1,2,3-triatsolia (kaavio 4). 1,3-dipolaarisen sykloaddition ominaisuuksien jäljittelemiseksi valittiin metalliksi kulta, koska sillä on kyky tuottaa diamagneettisia tuotteita. Tuloksena saatiin korkea saanto 4-fenyyli-1,5-bis-trifenyylifosfiinikulta(I)-1,2,3-triatsolia, joka muodostui värittöminä suurikokoisina kiteinä, jotka oli helppo eristää suodattamalla.¹⁰



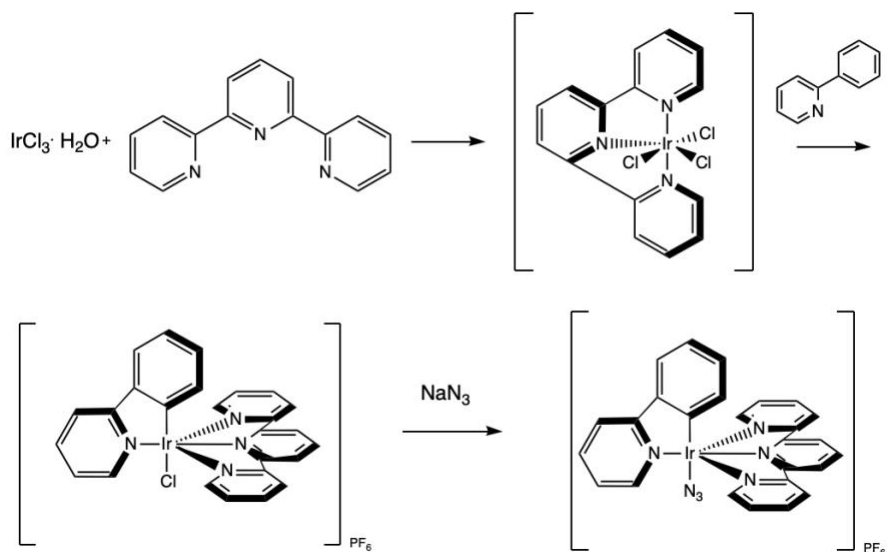
Kaavio 4. Esimerkki metalliatsidin ja metalliasetylidin välisestä napsautusreaktiosta, jonka tuotteena voi olla 1,5- tai 1,4-triatsoli.

Reaktio suoritettiin deuterioidussa kloroformissa, jolloin sen etenemistä voitiin seurata ^1H NMR-spektroskopiolla. Jo viiden minuutin kuluttua ilmestyi kaksoispiikki, josta voidaan karakterisoida 4-fenyyli-ryhmän orto-protoneita, mikä viittaa onnistuneeseen synteesiin. Kun käytetään $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -spektroskopiaa, niin huippuja voidaan tarkentaa laskemalla lämpötilaa -40°C :een. Tällöin nähdään toinen pienempi sarja kaksoispiikkejä, mikä viittaa 1,4-isomeerin olemassaoloon tuotteessa. Tämä reaktio on ensimmäinen epäorgaaninen versio 1,3-dipolaarisesta sykloadditiosta ja se nimettiin epäorgaaniseksi click-reaktioksi (iClick).¹⁰

3.2 Iridium(III) [3+2+1]- kompleksi

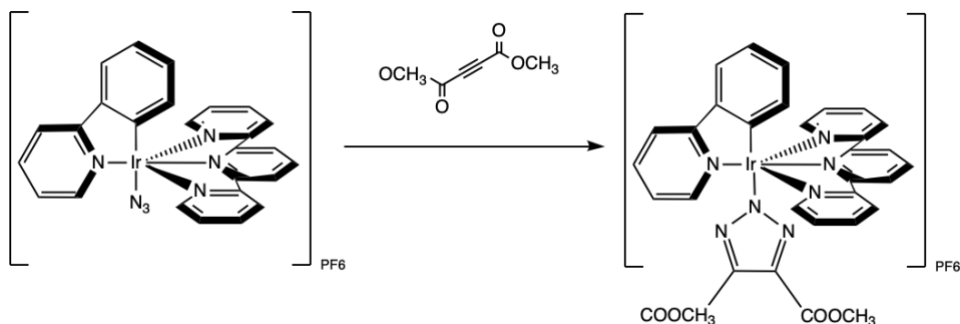
Iridiumkompleksin synteesi vaati kolmivaiheisen menetelmän, jossa kolmi-, kaksi- ja yksihampaiset ligandit lisätään peräkkäin. Prosessi alkaa IrCl_3 -terpyridiinikompleksien valmistuksella, jossa iridium(III)kloridihydraatti reagoi 2,2':6'2''-terpyridiinin kanssa. Tämän jälkeen kompleksin annetaan reagoida 2-fenyyli-terpyridiinin kanssa, jolloin muodostuu $[\text{IrCl}(\text{ppy})\text{-terpydiini}]\text{PF}_6$. Sen yksihampainen kloridiligandi voidaan vaihtaa atsidiksi käsittelemällä natriumatsidilla. Näin saadaan

epäorgaaniselle napsautusreaktiolle keskeinen kompleksi $[\text{Ir}(\text{N}_3)(\text{ppy})\text{-terpyridiini}]\text{PF}_6$ (kaavio 5), jota käytetään lähtöaineena triatsolaattikompleksien synteesiin. Saantoa voidaan kasvattaa noin 15–35 %:sta 80 %:iin suorittamalla reaktio hapettomassa ympäristössä.⁶



Kaavio 5. Kolmivaiheinen synteesi, jonka tuotteena on $[\text{Ir}(\text{N}_3)(\text{ppy})\text{-terpyridiini}]\text{PF}_6$.

Saatu rakenneyksikkö yhdistetään kaupallisesti sataavilla olevan dimetyyliasetyleenidikarboksylaatin kanssa asetonissa. Epäorgaaninen napsautusreaktio tapahtuu huoneenlämmössä yön yli. Tuloksen syntyy iridium(III)triasolaatikompleksi, jolla on [3+2+1] koordinaatorakenne. Iridiumkompleksin saanto on 88 % (kaavio 6).⁶

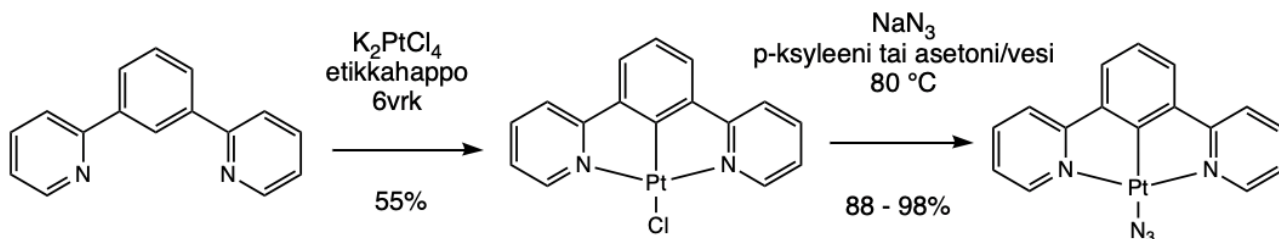


Kaavio 6. $[\text{Ir}(\text{N}_3)(\text{ppy})\text{-terpyridiini}]\text{PF}_6$:n ja dimetyyliasetyleenidikarboksylaatin välinen reaktio, jonka tuotteena on iridium(III)triasolaatikompleksi.

3.3 Platina(II) -kompleksi

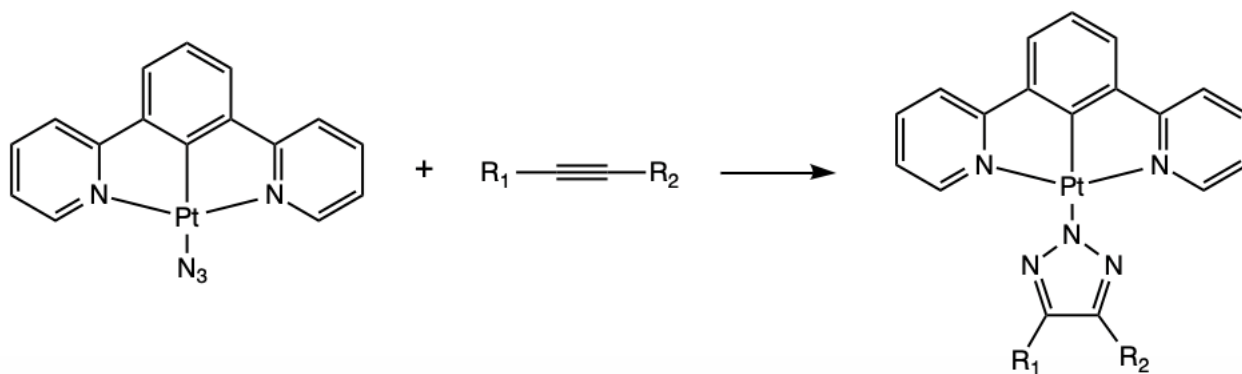
Platina(II) -kompleksin synteesi perustuu keskeiseen rakenneyksikköön eli $\text{PtCl}(\text{dpd})$:iin. $\text{PtCl}(\text{dpd})$ syntesoidaan yhdistämällä 1,3-di(2-pyridyyli)bentseeniä ja platinan tetrakloridisuolaa etikkahapossa refluksoiden kuuden päivän ajan. Muodostunut tuote huuhdellaan dietyylieetterillä, vedellä tai etanolilla. Tämän jälkeen tuote sekoitetaan ylimäärään natriumatsidia kuivassa p-ksyleenissä tai vesi-asetoniliuoksessa. Liuosta kuumennetaan 80 asteeseen, jolloin muunnos atsidokompleksiksi

tapahtuu (kaavio 7). Liuoksen jäädyttyä huonelämpötilaan lopputuote voidaan eristää suodattamalla.⁵



Kaavio 7. Kaksivaiheinen synteysi, jonka tuotteena on PtCl(dpd).

Kloridin onnistunut vaihtuminen atsidiligandiksi voidaan vahvistaa IR-spektroskopiolla, jossa havaitaan piikki 2030–2060 cm^{-1} alueella. Saatu metalliat sidikkompleksi toimii keskeisenä rakenneyksikkönä epäorgaanisessa napsutusreaktiossa (kaavio 8). Reagoimalla sitä eri elektronivajaiden alkyynien kanssa 1:1 -suhteessa voidaan syntesoida huoneenlämpötilassa haluttu platina(II)-kompleksi.⁵



Kaavio 8. Esimerkki metalliat sidikkompleksin ja alkyynin välisestä epäorgaanisesta napsutusreaktiosta.

4 Biokonjugaatiomenetelmät

4.1 Yleisesti fluoresenssileimatuista proteiineista *in vivo*

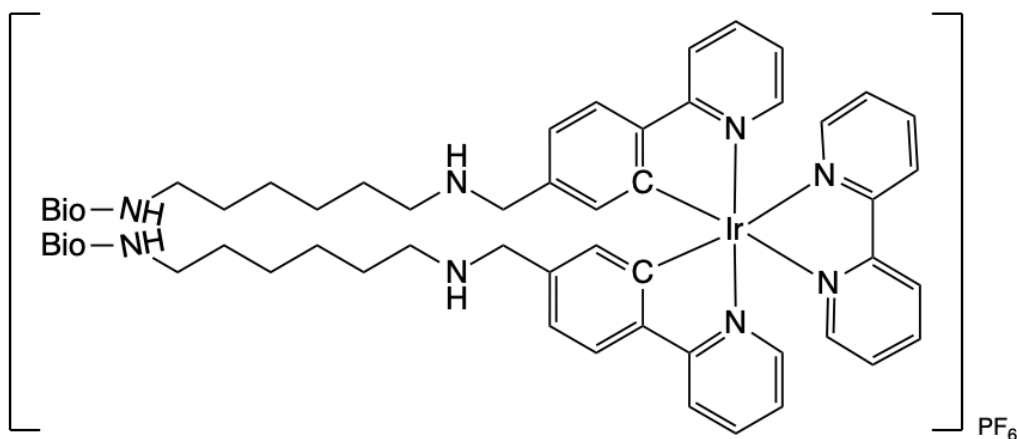
Fluoresenssileimatuilla proteiineilla on tavoitteena tutkia biomolekyylejä reaaliajassa eliöiden kudoksissa ilman, että leimat tai niiden fluoresoivat väriaineet vaikuttavat kohdeorganismien solujen fysiologiseen olomuotoon tai toimintaan. Yleisimmin käytetty reaktio elävien solujen proteiinien leimaamisessa on autofluoresoivan proteiinin fuusio (AFP). Yhdistämällä autofluoresoivaa ja kiinnostuksen kohteena olevaa proteiinia (POI) koodaavat geenit voidaan AFP-pohjaiset leimat valmistaa biologisesti.¹¹

Vaativammissa sovelluksissa, kuten superresoluutiomikroskopiassa ja yhden molekyylin tekniikoissa, tarvitaan orgaanisia fluoroforeja. Orgaanisilla fluoroforeilla on paremmat fotofysikaaliset ominaisuudet, esimerkiksi enemmän väri vaihtoehtoja, pienempi koko ja suurempi fotostabiilisuus. POI-kohteiden suora leimaaminen ei kuitenkaan ole yksinkertaista, sillä fluoresoivat koettimet voivat sitoutua tai reagoida spontaanisesti ei-tarkoitettujen POI:en kanssa.^{11,12}

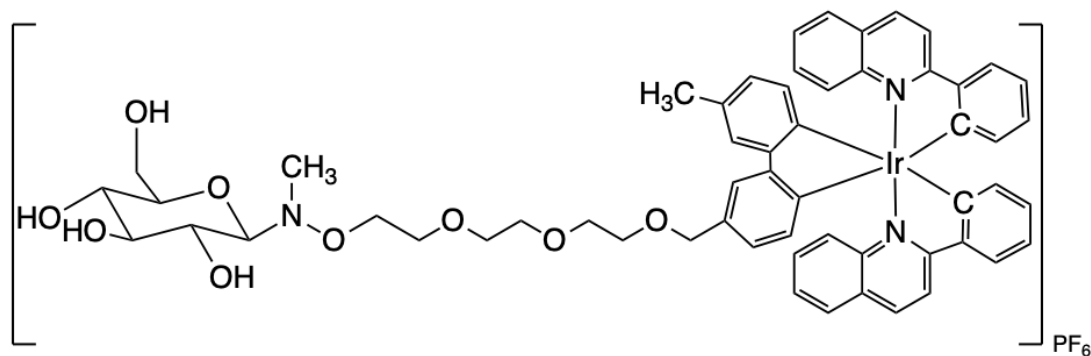
Spontaanisen reaktion merkitys on valtava, sillä tuotteen puoliintumisaika määräytyy POI:n eliniän mukaan. Prosessi on myös tasapainotettava kahden tekijän välillä eli biomolekyyliin kohdistettava häiriö on pidettävä mahdollisimman pienenä, mutta toisaalta saatava aikaan riittävän voimakas signaali, jotta POI:n kuvantaminen on luotettavaa. Tämä tasapaino on yksilöllinen jokaiselle POI:lle riippuen sen tehtävästä biologisessa järjestelmässä.¹³

4.2 Organometallikompleksileimat

Yksittäisten esimerkkien, jotka perustuvat $Cp^*Ir^{III}(N_3)$:n toimintaan rakenneyksikköinä¹⁴, lisäksi epäorgaanisella napsautusreaktioilla syntesoituja iridium(III) [3+2+1] komplekseja ei ole laajasti käytetty biokonjugointimenetelmänä.⁶ Iridium(III)-komplekseja on tutkittu kuvantamismenetelmänä vain monokationisina komplekseina, joihin on liitetty pieniä biomolekyyliä, kuten biotiini⁷ (kaavio 9) tai sokeri¹⁴(kaavio 10).



Kaavio 9. Monokationinen iridium(III)-kompleksi, johon on liitetty biotiini molekyyli.



Kaavio 10. Monokationinen iridium(III)-kompleksi, johon on liitetty sokeri molekyyli.

Varjoaineen kudoksen läpikulkuun kulunut aika eli MTT-analyysi osoitti, että epäorgaanisella napsautusreaktiolla syntesoidut biomolekyyllisolut alkoivat osoittaa sytotoksisuutta vasta 72 tunnin inkuboinnin jälkeen iridium(III)-kompleksin kanssa. Ensimmäisten 24 tunnin aikana solulinjassa ei havaittu yhdisteen vaikutuksia. Havaittiin myös, että kompleksi sitoutuu suhteellisen tehokkaasti POI:hin verrattuna muihin epäorgaanisella napsautusreaktiolla valmistettuihin organometallikomplekseihin.⁶

Epäorgaanisten napsautusreaktioiden modulaarisuuden ansiosta iridiumkomplekseja on helppoa suunnata kohti eri solunsisäisiä osia. Tämä modulaarisuus perustuu kompleksin lähtöaineiden eri funktionalisiin ryhmiin. Esimerkiksi varustettuna alkyneillä tai alkynoneilla epäorgaanisen napsautusreaktion kautta kyseiseen kompleksiin voi liittää biologisia kantajia.⁶

5 Johtopäätökset ja yhteenveto

Epäorgaanisten napsautusreaktioiden tutkimusalue kehittyi jatkuvasti. Niiden kinetiikkaa tutkitaan yhä aktiivisemmin, ja reaktioissa hyödynnettävien ligandien määrää kasvaa edelleen. Myös kompleksien ominaisuudet ovat tutkimuksesta tutkimukseen parantuneet, eivätkä luminoivat metallikompleksit enää hajoaa valovirityksessä liian äkillisesti. Näiden ominaisuuksien avulla organometallikompleksien funktionalisointimahdollisuudet tarjoavat kasvavan määrän uusia biokonjugointimenetelmiä.^{5,6,16}

Kaikesta edistyksestä huolimatta epäorgaanisissa napsautusreaktioissa on huomattavia puutteita metallien monimuotoisuuden suhteen. Siirtymämetallit 3d-5d -ryhmistä ovat suurelta osin vielä tutkimatta ja yleisesti luonnossa esiintyvät 3d-metallit on jätetty melkein kokonaan huomaamatta. Lisäksi sen sovellukset rajoittuvat pääasiassa ligandien toimintaan tai kemiallisiin muunnoksiin.^{1,5,6,18}

Lähteet:

1. Bird, R. E., Lemmel, S. A., Yu, X., & Zhou, Q. A. (2021). Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 32(12), 2457–2479. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>
2. Rossin, R., & Robillard, M. S. (2014). Pretargeted imaging using bioorthogonal chemistry in mice. *Current Opinion in Chemical Biology*, 21, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.07.023>
3. Lee, S., Koo, H., Na, J. H., Han, S. J., Min, H. S., Lee, S. J., Kim, S. H., Yun, S. H., Jeong, S. Y., Kwon, I. C., Choi, K., & Kim, K. (2014). Chemical Tumor-Targeting of Nanoparticles Based on Metabolic Glycoengineering and Click Chemistry. *ACS Nano*, 8(3), 2048–2063. <https://doi.org/10.1021/nn406584y>
4. Jiang, H., Zheng, T., Lopez-Aguilar, A., Feng, L., Kopp, F., Marlow, F. L., & Wu, P. (2014). Monitoring dynamic glycosylation in vivo using supersensitive click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 25(4), 698–706. <https://doi.org/10.1021/bc400502d>
5. Moreth, D., Hörner, G., Müller, V. V. L., Geyer, L., & Schatzschneider, U. (2023). Isostructural Series of Ni(II), Pd(II), Pt(II), and Au(III) Azido Complexes with a N[^]C[^]N Pincer Ligand to Elucidate Trends in the iClick Reaction Kinetics and Structural Parameters of the Triazolato Products. *Inorganic Chemistry*, 62(39), 16000–16012. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c02122>
6. Müller, V. V. L., Moreth, D., Kowalski, K., Kowalczyk, A., Gapińska, M., Kutta, R. J., Nuernberger, P., & Schatzschneider, U. (2024). Tuning The Intracellular Distribution of [3+2+1] Iridium(III) Complexes In Bacterial And Mammalian Cells By iClick Reaction With Biomolecular Carriers Functionalized With Alkynone Groups. *Chemistry - A European Journal*. <https://doi.org/10.1002/chem.202401603>
7. Zhang, K. Y., & Lo, K. K.-W. (2009). Synthesis, Properties, and Live-Cell Imaging Studies of Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Polypyridine Complexes Containing Two or Three Biotin Pendants. *Inorganic Chemistry*, 48(13), 6011–6025. <https://doi.org/10.1021/ic900412n>
8. Surana, K. R., Jadhav, S. G., Khairnar, R. K., Wagh, D. I., Mahajan, S. K., & Sonawane, D. D. (2024). Recent Concept of Importance: Click Chemistry. *Prog. Chem. Biochem. Res*, 7(4), 394–411. <https://doi.org/10.48309/PCBR.2024.461262.1361>
9. Best, M. D. (2009). Click chemistry and bioorthogonal reactions: Unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*, 48(28), 6571–6584. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bi9007726>
10. Del Castillo, T. J., Sarkar, S., Abboud, K. A., & Veige, A. S. (2011). 1,3-Dipolar cycloaddition between a metal-azide (Ph₃PAuN₃) and a metal-acetylide (Ph₃PAuCCPh): An inorganic version of a click reaction. *Dalton Transactions*, 40(32), 8140–8144. <https://doi.org/10.1039/c1dt10787a>
11. Nikic, I., Kang, J. H., Girona, G. E., Aramburu, I. V., & Lemke, E. A. (2015). Labeling proteins on live mammalian cells using click chemistry. *Nature Protocols*, 10(5), 780–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.045>

12. Fernández-Suárez, M., & Ting, A. (2009). Fluorescent Probes for Super-Resolution Imaging in Living Cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9, 929–943. <https://doi.org/10.1038/nrm2531>
13. Chudakov, D. M., Matz, M. v., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews* 90(3)1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
14. Hua-Wei Liu, Zhang, K. Y., Law, W. H. T., & Lo, K. K. W. (2010). Cyclometalated iridium(III) bipyridine complexes functionalized with an N-methylamino-oxy group as novel phosphorescent labeling reagents for reducing sugars. *Organometallics*, 29(16), 3474–3476. <https://doi.org/10.1021/om100597g>
15. Peng, K., Mawamba, V., Schulz, E., Löhr, M., Hagemann, C., & Schatzschneider, U. (2019). iClick Reactions of Square-Planar Palladium(II) and Platinum(II) Azido Complexes with Electron-Poor Alkynes: Metal-Dependent Preference for N1 vs N2 Triazolite Coordination and Kinetic Studies with ¹H and ¹⁹F NMR Spectroscopy. *Inorganic Chemistry*, 58(17), 11508–11521. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01304>
16. Giner, E. A., Gómez-Gallego, M., Casarrubios, L., de la Torre, M. C., Ramírez de Arellano, C., & Sierra, M. A. (2017). Effect of a κ^1 -Bonded-M-1,2,3-triazole (M = Co, Ru) on the Structure and Reactivity of Group 6 Alkoxy (Fischer) Carbenes. *Inorganic chemistry*, 56(5), 2801–2811. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02957>
17. Allampally, N. K., Daniliuc, C.-G., Strassert, C. A., & de Cola, L. (2015). Tuning the Structural and Photophysical Properties of Cationic Pt(II) Complexes Bearing Neutral Bis(triazolyl)pyridine Ligands. *Inorganic Chemistry*, 54(4), 1588–1596. <https://doi.org/10.1021/ic5025636>