

Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition for PET molecular imaging study

Hyeon Jin Jeong and Dong Wook Kim*

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Inha University, Incheon, Korea

ABSTRACT

^{18}F -labeling reaction of bioactive molecule via click chemistry is widely used to produce ^{18}F -labeled radiotracer in the field of radiopharmaceutical science and molecular imaging. In particular, bioorthogonal strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) reaction has received much attention as an alternative ligation method for radiolabeling bioactive molecules such as peptides, DNA, proteins as well as nanoparticles. Moreover, SPAAC based pretargeting method could provide tumor images successfully on positron emission tomography system using nanoparticle such as mesoporous silica nanoparticles.

J Radiopharm Mol Probes 1(1):15-22, 2015

Key Words: Bioorthogonal reaction, ^{18}F -labeling, Radiotracer, Positron emission tomography, Copper-free click chemistry, Pretargeting

Introduction

양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET)은 살아있는 생명체의 생리화학적 현상을 실시간으로 관찰하는데 있어 매우 유용한 의학적 영상 장비이다. 특히 최근에는 신약 개발에도 PET 영상 장비가 폭 넓게 응용되고 있다(1,2). Fluorine-18 (F-18, $t_{1/2}$ = 109.8 min), Carbon-11 ($t_{1/2}$ = 20.4 min), Nitrogen-13 ($t_{1/2}$ = 10 min), Gallium-68 ($t_{1/2}$ = 67.7 min), Copper-64($t_{1/2}$ = 12.7 min)와 같이 양전자를 방출하는 다양한 방사성동위원소가 현재까지 개발되었으며 이들 방사성동위원소로부터 목적에 맞는 방사성의약품을 제조하여 PET 영상을 얻고 있다(3,4). 위에서 언급한 다양한 종류의 양전자 방출 방사성동위원소 중에서 F-18은 생산하기 쉽고 화학적, 생물학적 안정성 때문에 PET 분자 영상 연구에 널리 이용되는 양전자 방출 방사성동위원소이다. 또한 F-18은 분자내의 탄소와 안정한 공유결합 형성하고 원소 자체의 작은 크기로 인해 적은 입체장애를 가지기 때문에 F-18을 이용하여 표지를 하더라도 표지된

화합물은 단백질 및 수용체와 상호 결합력을 본래의 원 화합물과 유사하게 유지될 수 있다(3-7). 따라서 새로운 F-18 표지방법 연구는 PET 용 방사성의약품 개발에 매우 중요한 연구 분야이다.

Copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition (CuAAC)은 “click chemistry”라고 불리며, 최근에 방사성의약품 및 펩타이드와 같은 생체활성 분자의 동위원소 표지 반응에 활발하게 적용되고 있다(8-12). 그러나 CuAAC 반응에 필요한 구리 촉매는 반응 중 때때로 분리가 어려워 화합물 내에 잔류하여 독성을 나타낼 수 있고, 구리 촉매가 생체활성 분자의 작용기와 상호작용을 하여 분자의 변성을 일으키거나 CuAAC 반응 속도를 늦추는 등의 단점 때문에 이러한 CuAAC 반응이 동위원소 표지 반응에 널리 사용되는 데에 어려움이 있다(13-15). 최근에 Bertozzi 연구팀에 의해 구리 촉매를 사용하지 않는 클릭 반응의 일종인 strain-promoted alkyne azide cycloaddition (SPAAC) 반응이 새로운 분자간 컨주게이션 반응으로써 생물학 분야 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있다는 연구결과가 보

Received March 13, 2015 / Revised March 25, 2015 / Accepted March 26, 2015

Corresponding Author: Dong Wook Kim

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Inha University, 100 Inha-ro, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7679, Fax: +82-32-867-5604, E-mail: kimdw@inha.ac.kr

Copyright © 2015, The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

고되었다. 이 반응은 “copper-free chemistry”라고도 불려지고 있다. 현재까지 SPAAC 반응에 사용되고 많은 종류의 cyclooctyne 유도체들이 개발되었다(16-26). 특히, copper-free SPAAC 반응은 방사성동위원소를 이용한 분자영상 연구에 활발하게 이용되고 있으며 펩타이드와 같은 거대 생체활성 분자와 동위원소가 표지 신티온(synthron)간의 생체적합성 컨주게이션 반응에 매우 유용한 것으로 알려져 있다. 이에 따라 Figure 1에서와 같이cyclooctyne화합물의 반응성과 친수성을 고려할 때 dibenzocyclooctyne (DIBO) 나 aza-dibenzocyclooctyne(ADIBO) 등과 같은 cyclooctyne 유도체들은 이러한 목적의 SPAAC 반응을 위해 널리 사용되고 있다(27-30).

1. F-18을 이용한 일반적인 펩타이드 표지방법

최근 phage display 나 combinatorial chemistry 기법을 통해 많은 생리 활성을 갖는 펩타이드 서열이 발견되고 있다. 특히 phage display 로부터 종양을 표적할 수 있는 약 160여개의 펩타이드 서열이 밝혀졌다(31). 새롭게 발견된 펩타이드는 체내에서 특정생체 분자와 상호작용하는 타겟을 명확히 밝힐 수 있기 때문에 이러한 펩타이드를 F-18과 같은 방사성동위원소로 표지하여 새로운 분자영상제제를 개발하는 것은 암 조기진단이나 PET 분자 영상

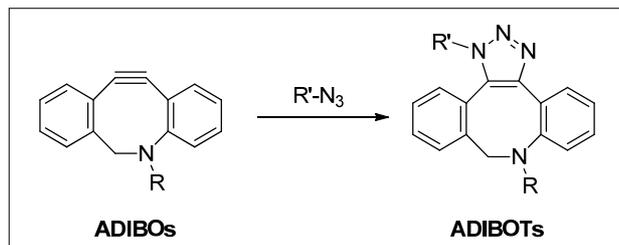


Figure 1. Representative strain-promoted alkyne azide-cycloaddition (SPAAC) reaction of aza-dibenzocyclooctynes (ADIBOs) with azides to form aza-dibenzo-cycloocta-triazoles (ADIBOTs).

연구를 수행하는데 있어 중요한 연구 주제라 할 수 있다 (32). F-18을 펩타이드에 표지하는 방법으로는 두 가지 접근 방법이 있다. 하나는 no-carrier-added(nca) [¹⁸F]fluoride 을 직접 펩타이드에 표지 하는 방법이고, 다른 하나는 Figure 2와 같이 안정한 빌딩블록 분자에 F-18을 표지하여 F-18이 표지된 신티온(또는 빌딩블럭)을 합성하고 펩타이드 같은 생체분자와 컨주게이션 반응을 통하여 연결하는 간접적인 방법이다(33,34). 그중 직접적인 표지방법은 유기 용매 하에서 불소화 반응이 진행되는 동안 F-18이 생리 활성 펩타이드에 도입될 때 강한 열기 반응조건으로 인해 생리 활성 펩타이드 분자의 변성을 유발하며 수율 또한 매우 낮아 때문에 적합한 반응조건이 아니다. 따라서 F-18이 표지된 신티온을 합성하고 이를 생체 활성 펩타이드에 연결하는 간접적인 방법이 펩타이드를 방사성동위원소인 F-18로 표지하는 데 있어 널리 사용되는 방법이다. 간접적인 표지 방법은 생체와 유사한 조건(pH ≈ 7, 상온 등)에서 펩타이드의 아민 또는 싸이올 작용기 등을 이용하여 아민화, 알킬화, 아실화 반응 등으로 F-18이 표지된 빌딩블럭 분자와 펩타이드 간의 안정적인 컨주게이션 반응을 통하여 펩타이드를 표지하는 방법을 말한다. 그러나 이러한 간접적인 펩타이드 방사성 동위원소 표지 방법은 널리 이용되는 일반적인 방법임에도 불구하고 다음과 같은 합성적 한계가 존재한다(33,34). 첫째로, F-18가 표지된 펩타이드 합성은 유기 용매, 반응성이 강한 화학 약품 또는 시약에 의한 펩타이드의 변성 때문에 종종 실패하기도 한다. 둘째로, F-18표지된 빌딩블록을 이용한 컨주게이션 반응에서는 짧은 반응시간과 높은 방사화학적 수율 (radiochemical yield, RCY)을 위해 과량의 펩타이드 전구체가 사용되기 때문에 별도로 고성능 액상크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 사용하는 정제과정을 필요로 한다. 그러나 이러한 복잡한 정제 과정은 짧은 반감기를 갖는 F-18의 특성을 고려한다면 필연적으로 낮은 RCY로 F-18가 표지된 펩타이드를 얻을 수

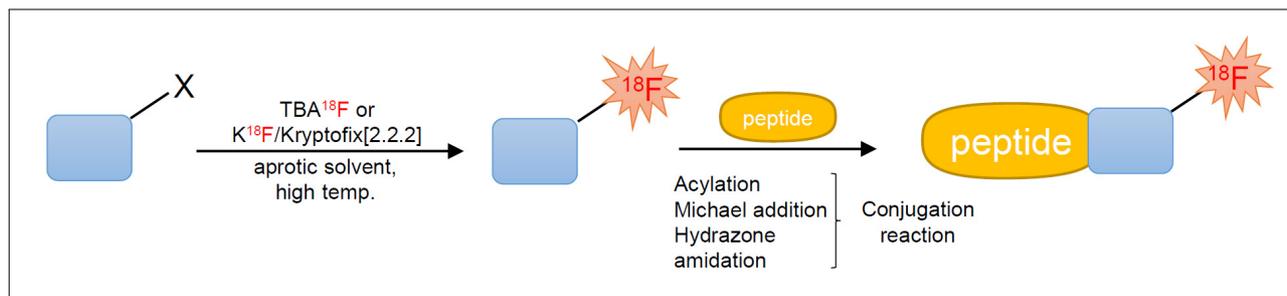
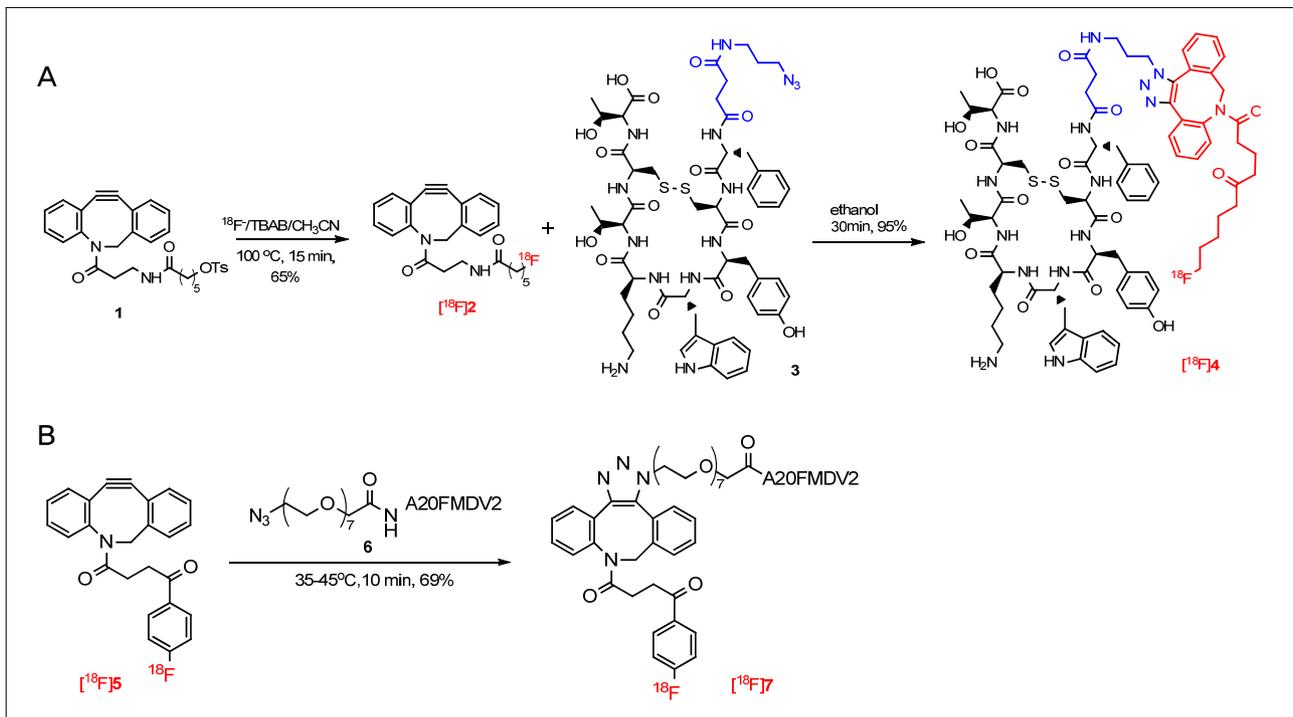


Figure 2. General synthetic route for the synthesis of ¹⁸F-labeled peptide compounds.



Scheme 1. F-18 labeling protocol based on the copper-free SPAAC reaction using the azido-substituted peptides with F-F-18 labeled ADIBO synthon to prepare ^{18}F -labeled peptide tracers.

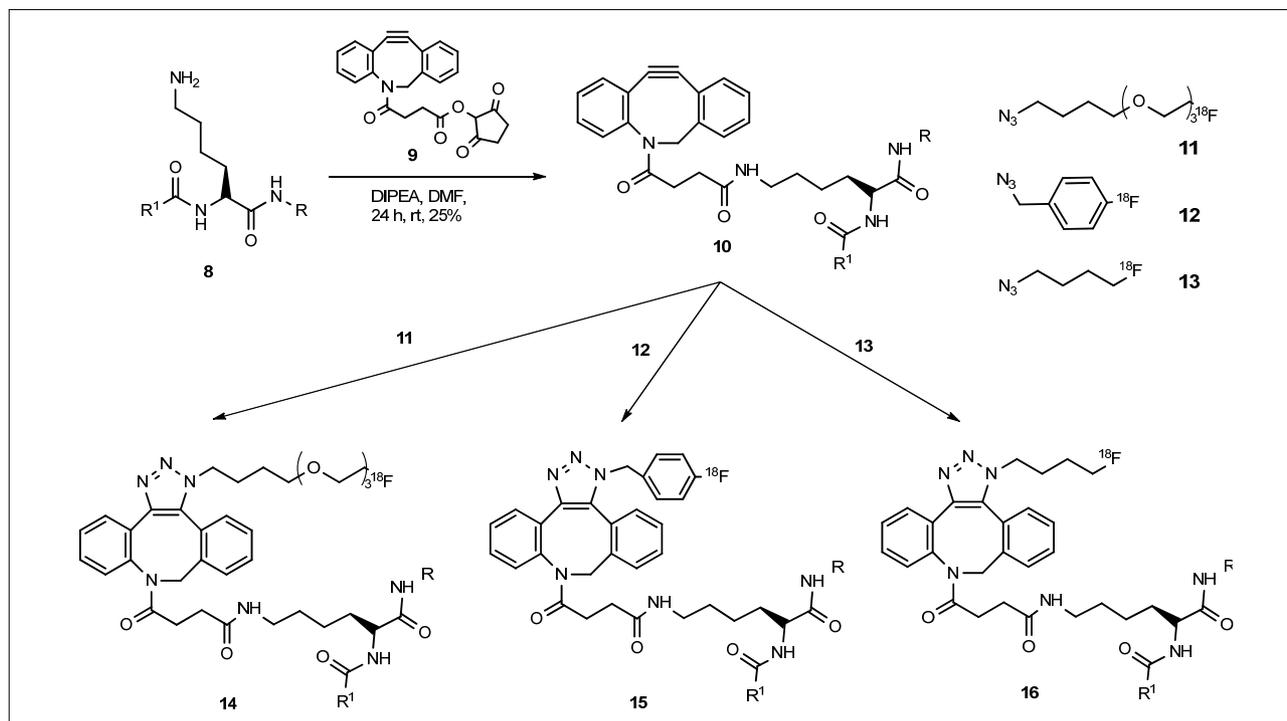
밖에 없게 된다. 마지막으로 F-18가 표지된 펩타이드는 표지가 되지 않은 과량의 펩타이드 전구체와 화학적 특성이 유사하여 때때로 HPLC에서 분리가 불가능한 경우도 발생하여 매우 낮은 비방사능(specific activity, SA)을 갖게 되어 독성을 갖거나 낮은 품질의 PET 영상을 얻게 될 수 있는 문제점이 있다(33-35).

2. Chemo-orthogonal SPAAC 반응을 이용한 F-18의 펩타이드 표지

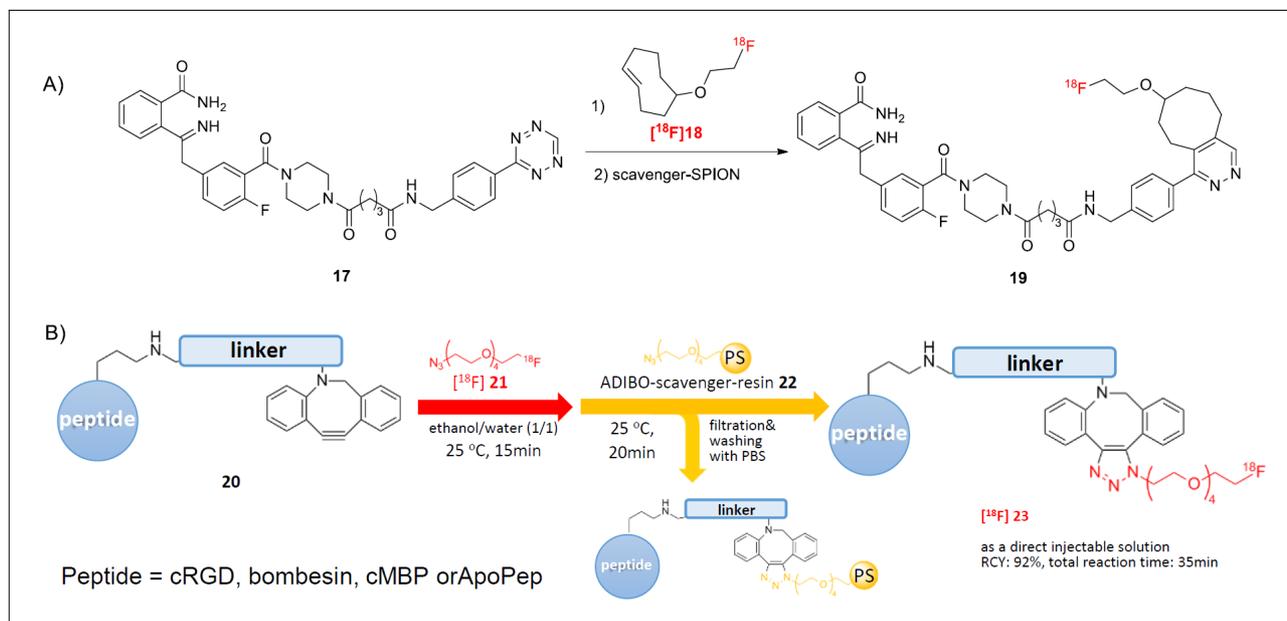
최근에 Copper-free SPAAC 반응은 F-18이 표지된 빌딩 블록과 펩타이드 간의 chemo-orthogonal 컨주게이션 반응과 같이 펩타이드에 F-18을 표지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. SPAAC 반응을 이용한 F-18 표지 반응은 ADIBO 화합물에 F-18을 표지하여 아자이드가 도입된 펩타이드 전구체와의 copper-free SPAAC반응을 이용하는 방법과 이와 반대로 아자이드가 도입된 화합물에 F-18을 표지하여 ADIBO작용기가 도입된 펩타이드 전구체와 copper-free SPAAC반응을 이용하는 방법이 있다(27). 첫 번째로 ADIBO화합물에 F-18을 표지한 후 아자이드가 도입된 펩타이드와의 SPAAC 반응을 통해 표지하는 방법

은 Sutcliffe 연구팀에 의해 처음 시도되었다(36). Scheme 1A와 같이 인테그린 $\alpha_v\beta_6$ 에 결합하는 N_3 -Tyr3-octreotate(TATE)펩타이드에 아자이드를 치환해 아자이드 펩타이드 전구체3를 합성한 후 F-18이 표지된 ADIBO빌딩블록 $[^{18}\text{F}]2$ 이용해 SPAAC반응을 통하여 $[^{18}\text{F}]4$ 을 합성하였다(37). F-18이 표지된 ADIBO 빌딩블록 $[^{18}\text{F}]2$ 은 1을 용해시킨 acetonitrile에서 tetraethylammonium bicarbonate와 $[^{18}\text{F}]$ fluoride를 사용하여 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 15분간 반응시켰을 때 65% RCY로 얻어졌고 HPLC로 정제한 $[^{18}\text{F}]2$ 를 에탄올에 N_3 -Tyr3-octreotate를 용해시킨 용액을 첨가하여 30분 동안 SPAAC반응을 진행시켰을 때 이 반응은 $[^{18}\text{F}]2$ 에서 $[^{18}\text{F}]4$ 로 95%의 전환율을 보였다(36-38). 또한 Scheme 1B에서 처럼 위의 방법을 이용하여 FBA-C6-ADIBO에 F-18을 표지한 ADIBO 빌딩블록 $[^{18}\text{F}]5$ 를 제조한 후 이를 N_3 -PEG7-A20FMDV2 (6)와 10분 동안 ethanol에서 반응하여 69% 수득률로 F-18이 표지된 펩타이드 $[^{18}\text{F}]7$ 합성한 결과도 보고되었다(38).

Copper-free SPAAC 반응을 이용한 다른 접근의 F-18표지 방법은 Campbell-Verduyn 연구팀에 의해서 보고되었다. 이 방법에서는 펩타이드가 포함된 ADIBO 화합물과 F-18이 표지된 아자이드 화합물 빌딩블록을 SPAAC 컨주게이션 표지 반응에 이용했다. 가스트린 방출 펩타이드



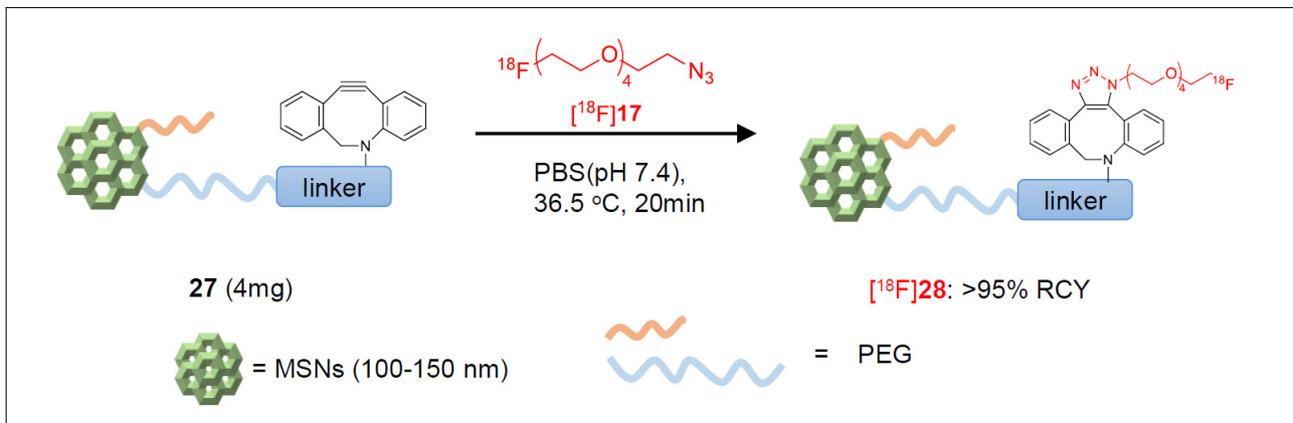
Scheme 2. SPAAC conjugation reaction of three ^{18}F -labeled azides using ADIBO group tethered bombesin peptide.



Scheme 3. (A) Chemically orthogonal scavenger-assisted high performance F-18 labelling method using tetrazine-cyclooctene conjugation reaction without HPLC purification. (B) Preparation of F-18 labeled peptides and subsequent chemo-orthogonal purification using a polystyrene-supported azide resin 22.

수용체에 결합할 수 있는 lys[3]-bombesin 펩타이드 8에 ADIBO-NHS (9)를 치환하여 ADIBO가 도입된 전구체 펩타이드 10을 합성하였고, 각각 다른 세 가지 F-18이 표지된 아자이드 빌딩 블록(11-13)을 DMF에서 15분동안 상온

처리하였을 때 F-18이 표지된 bombesin 펩타이드 유도체(^{18}F 14, ^{18}F 15, ^{18}F 16)가 19-37% RCY와 57-62 GBq/ μmol 의 SA로 얻어졌다(Scheme 2). F-18이 표지된 아자이드 빌딩 블록 화합물이 F-18이 표지된 ADIBO 빌딩블록 화합물에



Scheme 4. SPAAC reaction of ADIBO tethered MSNs with ^{18}F -labeled azide synthon under physiologically friendly reaction condition.

비하여 상대적으로 더 좋은 반응의 수율성 및 높은 RCY를 보여주고 있다(39).

3. Chemo-orthogonal scavenger 수지를 이용한 친생체 반응 조건하에서 펩타이드 표지

SPAAC 반응은 별도의 촉매나 시약 없이 수용성 용매 안에서 반응이 잘 진행되는 것으로 잘 알려졌다(16). 이러한 SPAAC반응의 특성을 기반으로 생리학적으로 유사한 반응 조건에서 (상온, pH=7, 수용액 용매) 펩타이드의 변성 없이 쉽게 다룰 수 있다. 2012년, 본 연구팀에서는 RGD, bombesin, cMBP, ApoPep 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는 펩타이드에 ADIBO 작용기를 도입하여 F-18이 표지된 아자이드 빌딩블럭 화합물 $[^{18}\text{F}]21$ 을 이용하여 SPAAC반응을 통해 다양한 PET용 펩타이드 방사성 추적자를 합성하였다(40). 2011년, Weissleder연구팀에 의해 F-18이 표지된 trans-cyclooctene ($[^{18}\text{F}]18$)과 tetrazine 작용기가 도입된PARP1 억제제 유도체 화합물 17 사이에서 chemical orthogonal conjugation 반응을 이용한 표지 반응이 시도되었으며, 과량의 tetrazine 전구체 17 화합물을 trans-cyclooctene이 표면에 붙은 산화철 나노입자를 이용하여 HPLC를 사용한 분리과정 없이 제거하는 것에 성공하였다(Scheme 3A) (41). 이러한 chemo-orthogonal scavenger 개념을 기초로 본 연구팀에서는 polystyrene 아자이드 수지를 합성하였고 이를 이용하여 SPAAC 표지 반응 후 반응하지 않고 남은 과량의 ADIBO 펩타이드 전구체를 HPLC 분리과정 없이 성공적으로 제거하였다. Scheme 3B에서 보는 바와 같이 ADIBO 펩타이드 전구체와 아자이드 빌딩블럭 화합물 $[^{18}\text{F}]21$ 간의 SPAAC반응에 이어 아자이드 수지로 처리했을 때 다양한 F-18 표지 펩타이드 유도체를

SA는 55-45 GBq/ μmol 로 RCY는 90-20%로 동시에 얻을 수 있었다(40). Scavenger고분자 수지를 이용한 SPAAC F-18 표지 방법은 여러 가지 다양한 펩타이드를 손 쉽게 high throughput synthesis 개념으로 F-18로 표지하여 다양한 PET용 방사성의약품 개발에 큰 도움이 될 것으로 기대되고 있다.

4. Pretargeting 기법을 이용한 다공성 실리카 나노입자(MSN)의 F-18 표지

최적의 크기와 구조로 설계된 나노 입자나 나노 크기의 고분자 물질은 EPR (enhanced permeability and retention) 효과를 통해 종양 조직에 축적되어 암을 조기에 진단하거나 치료할 수 있기 때문에 최근 나노의학은 생명과학 분야에서 많은 관심을 갖고 연구하는 분야이다(42-47). 특히 다공성 실리카 나노입자(MSN)는 치료나 진단을 위한 약물을 담지 할 수 있는 충분한 크기의 많은 홀과 넓은 표면적을 가지며 또한 세포독성도 적고 생화학적으로 안정하며 표면 개질이 쉽기 때문에 약물이나 유전자의 운반 플랫폼, 바이오이미징, cell marker 등의 다양한 응용분야에서 중요한 운반자로서 이용될 수 있다(48). 따라서 나노 입자를 적절한 동위원소로 표지하여 PET 분자영상 기법에서 이용할 수 있다면 생체 내에서 실시간 추적이 가능하여 나노 입자의 약물동태학적 연구나 약물전달시스템 연구에 큰 도움이 될 것으로 예상된다. 그러나, 일반적으로 나노입자가 종양 조직에 EPR 효과로 도달하기 위해서는 하루 이상의 체내 혈류 순환 시간이 필요하다. 따라서 F-18은 짧은 반감기 때문에 이러한 목적을 위한 나노 입자의 표지에는 적합하지 않은 방사성 동위원소이다(3-5). 2013년, 본 연구팀은 SPAAC 반

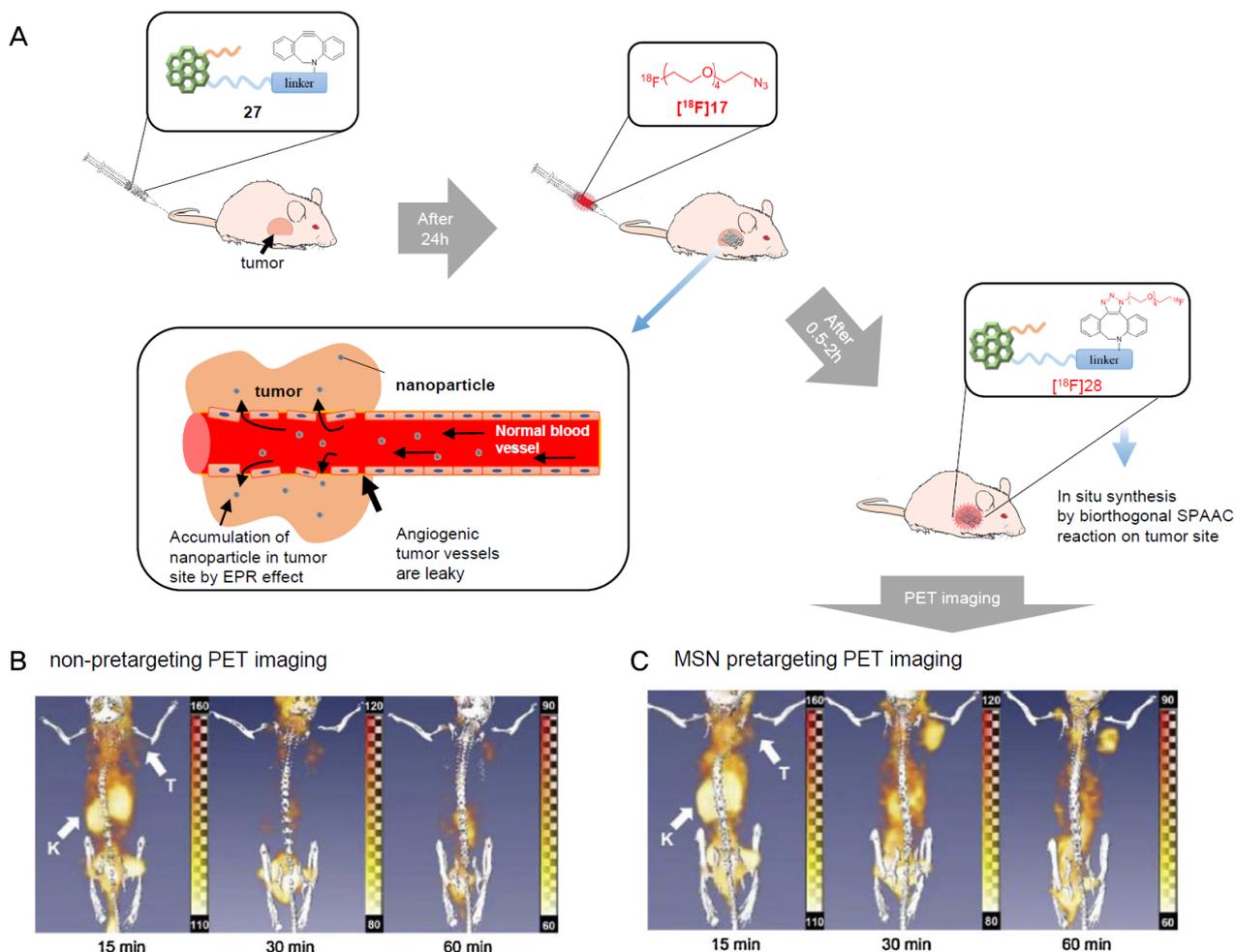


Figure 3. (A) Procedure for synthesis of ^{18}F -labeled MSNs (^{18}F 28) in a living specimen by an in situ SPAAC reaction for the MSNs pretargeting study. (B) PET-CT images of ^{18}F -labeled azide (^{18}F 17) in a U87MG tumor-bearing mouse (non-pretargeted). (C) PET-CT images of ^{18}F -labeled azide (^{18}F 17) in a mouse given ADIBO-PEG-MSNs 28 24 h earlier (pretargeted) recorded at 15, 30, and 60 min after injection. T = tumor, K = kidneys..

응을 이용한 pretargeting 기법을 이용하여 생체 내에서 반감기가 짧은 F-18을 MSN에 표지하는 데 성공했으며 이를 통해 나노 입자인 MSN으로부터 중앙 PET 영상을 얻은 것을 보고하였다(49). 먼저 이를 위해 MSN의 크기가 EPR 효과에 의해 중앙에 축적 가능한 100-150 nm 정도의 크기로 제조한 후 이를 PEG로 표면 처리하고 MSN의 PEG 말단에 ADIBO를 치환하여 ADIBO-PEG-MSN 27을 제조하였다(49). 체내에서의 SPAAC 반응 진행과 효율을 확인하기 위해 Scheme 4에 나타난 바와 같이 합성된 나노입자 ADIBO-PEG-MSN 27 (4 mg, ADIBO 치환기 0.48 mmol 포함)과 F-18이 표지된 아자이드 화합물 ^{18}F 17의 SPAAC 반응을 체내 환경과 유사한 조건하에서(PBS에서 pH 7.4, 36.5°C) 진행하였다. 이 SPAAC 반응은 15-20 분 이내에 완료되고 거의 정량적인 RCY로 F-18이 표지된 MSN을 제공

한다.

체내 환경과 유사한 조건하에서 빠른 SPAAC 반응 속도, 그리고 MSN의 EPR 효과를 통한 중앙 축적 가능성을 고려하여 체내 시스템에서 SPAAC 표지 반응을 기반으로 하는 MSN의 pretargeting 기법을 이용한 중앙 마우스 모델에서 나노입자 MSN의 PET 영상 연구를 진행하였다. Figure 3A는 MSN을 이용한 PET 영상 획득에 있어 SPAAC 반응을 기반으로 하는 pretargeting 기법과 나노입자의 EPR 효과를 도식적으로 표현해주고 있다. Figure 3C의 PET-CT 영상은 ADIBO-PEG-MSNs 27을 24시간 전에 투여한 마우스 모델(MSN pretargeting 모델)에서 ^{18}F 17 투여 30분 후부터 지속적으로 강한 중앙 영상을 보여주고 있고, 그에 반하여 ^{18}F 17만 투여한 non-pretargeting 마우스에서는 방사능 신장 통한 빠른 배출과 함께 상당히 낮은

종양 흡수율이 관찰되었다(Figure 3B). MSN pretargeting 기법은 살아있는 생명체의 체내 종양 부위에서 SPAAC 반응을 통하여 F-18이 표지된 MSN인 [¹⁸F]28을 형성함으로써 MSN을 사용하여 PET 시스템을 통해 종양을 영상화할 수 있었다.

Conclusion

클릭 화학의 개념은 방사성 의약품 및 분자 이미징 분야에서 체내와 유사한 조건에서 F-18을 표지한 방사성 빌딩블록을 생리활성 분자에 도입하는데 널리 응용되고 있다. Chemo-, bio-orthogonal copper-free SPAAC의 결합 반응은 펩타이드 등의 생리활성 고분자나 나노입자에 F-18 표지를 위한 새로운 합성 전략이 되고 있다. 특히 생리학적 으로 유사한 반응 조건에서 F-18 아자이드 신티온과 ADIBO-펩타이드 전구체를 이용한 SPAAC 컨주게이션 F-18 표지 반응은 방사성의약품 자동 생산과 펩타이드 방사성의약품의 high-throughput 합성을 위해 유용할 것이다. 또한 SPAAC 반응을 기반으로 하는 pretargeting 기법은 체내에서 선택적 표적을 위해 긴 혈류 순환시간이 필요한 나노입자나 단백질, 유전자 등과 같은 거대분자 화합물의 F-18 표지 반응 및 이를 이용한 PET 영상 연구에 도움을 줄 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This work was supported by Basic Science Research Program (grant code: NRF-2014R1A2A2A03007401) and Nuclear Research & Development Program (grant code: NRF-2014M2A2A7045045 and 2014M2B2A4031992) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future Planning.

References

- Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9226-9233.
- Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;17:545-580.
- Vallabhajosula S. Molecular imaging radiopharmaceuticals for PET and SPECT. 1st ed. New York: Springer; 2009. p. 133-193.
- Ametamey SM, Honer M, Schubiger PA. Molecular imaging with PET. *Chem Rev* 2008;108:1501-1516.
- Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2002;2:683-693.
- Schirmmayer R, Wängler C, Schirmmayer E. Recent developments and trends in ¹⁸F-radiochemistry: syntheses and applications. *Mini-Rev Org Chem* 2007;4:317-329.
- Kim DW, Ahn D-S, Oh Y-H, Lee S, Kil HS, Oh SJ, Lee SJ, Kim JS, Ryu JS, Moon DH, Chi DY. A new class of SN₂ reactions catalyzed by protic solvents: facile fluorination for isotopic labeling of diagnostic molecules. *J Am Chem Soc* 2006;128:16394-16397.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2001;40:2004-2021.
- Mamat C, Ramenda T, Wuest FR. Recent applications of click chemistry for the synthesis of radiotracers for molecular imaging. *Mini-Rev Org Chem* 2009;6:21-34.
- Mindt TL, Struthers H, Brans L, Anguelov T, Schweinsberg C, Maes V, Tourwé D, Schibli R. "Click to chelate": synthesis and installation of metal chelates into biomolecules in a single step. *J Am Chem Soc* 2006;128:15096-15097.
- Thonon D, Kech C, Paris J, Lemaire C, Luxen A. New strategy for the preparation of clickable peptides and labeling with 1-(azidomethyl)-4-[¹⁸F]-fluorobenzene for PET. *Bioconj Chem* 2009;20:817-823.
- Maschauer S, Einsiedel J, Haubner R, Hocke C, Ocker M, Hübner H, Kuwert T, Gmeiner P, Prante O. Labeling and glycosylation of peptides using click chemistry: a general approach to ¹⁸F-glycopeptides as effective imaging probes for positron emission tomography. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49:976-979.
- Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16793-16797.
- Lallana E, Fernandez-Megia E, Riguera R. Surpassing the use of copper in the click functionalization of polymeric nanostructures: a strain-promoted approach. *J Am Chem Soc* 2009; 131:5748-5750.
- Kennedy DC, McKay CS, Legault MC, Danielson DC, Blake JA, Pegoraro AF, Stalow A, Mester Z, Pezacki JP. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions. *J Am Chem Soc* 2011;133:17993-18001.
- Sletten EM, Bertozzi CR. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc Chem Res* 2011;44:666-676.
- Debets MF, van Berkel SS, Dommerholt J, Dirks AT, Rutjes FP, van Delft FL. Bioconjugation with strained alkenes and alkynes. *Acc Chem Res* 2011;44:805-815.
- Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev* 2010;39:1272-1279.
- Sletten EM, Bertozzi CR. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed* 2009;48:6974-6998.

20. Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR. In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science* 2008;320:664-667.
21. Jewett JC, Sletten EM, Bertozzi CR. Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones. *J Am Chem Soc* 2010;132:3688-3690.
22. Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2014;35:4969-4985.
23. Carroll L, Evans HL, Aboagye EO, Spivey AC. Bioorthogonal chemistry for pre-targeted molecular imaging-progress and prospects. *Org Biomol Chem* 2013;11:5772-5781.
24. Bouvet V, Wuest M, Wuest F. Copper-free click chemistry with the short-lived positron emitter fluorine-18. *Org Biomol Chem* 2011;9:7393-7399.
25. Ostrovskis P, Volla C.M.R, Turks M, Markovic D. Application of metal free click chemistry in biological studies. *Curr Org Chem* 2013;17:610-640.
26. Baskin JM, Bertozzi CR. Copper-free click chemistry: bioorthogonal reagents for tagging azides. *Aldrichim Acta* 2010; 43:15-23.
27. Pretze M, Pietzsch D, Mamat C. Recent trends in bioorthogonal click-radiolabeling reactions using fluorine-18. *Molecules* 2013; 18:8618-8665.
28. Ning X, Guo J, Wolfert MA, Boons GJ. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47: 2253-2255.
29. Poloukhina AA, Mbua NE, Wolfert MA, Boons GJ, Popik VV. Selective labeling of living cells by a photo-triggered click reaction. *J Am Chem Soc* 2009;131:15769-15776.
30. Debets MF, van Berkel SS, Schoffelen S, Rutjes FP, van Hest JC, van Delft FL. Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem Commun (Camb)* 2010;46:97-99.
31. Deutscher SL. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev* 2010;110:3196-3211.
32. Chen K, Conti PS. Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1005-1022.
33. Okarvi SM. Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* 2001;28:929-938.
34. Wuest F. Aspects of positron emission tomography radiochemistry as relevant for food chemistry. *Amino Acids* 2005; 29:323-339.
35. Lee S, Xie J, Chen X. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis. *Chem Rev* 2010;110:3087-3111.
36. Carpenter RD, Hausner SH, Sutcliffe JL. Copper-free click for PET: rapid 1,3-dipolar cycloadditions with a fluorine-18 cyclooctyne. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:885-889.
37. Arumugam S, Chin J, Schirrmacher R, Popik VV, Kostikov AP. [18F]Azadibenzocyclooctyne ([18F]ADIBO): a biocompatible radioactive labeling synthon for peptides using catalyst free [3+2] cycloaddition. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:6987-6991.
38. Hausner SH, Carpenter RD, Bauer N, Sutcliffe JL. Evaluation of an integrin $\alpha_v\beta_6$ -specific peptide labeled with [18F]fluorine by copper-free, strain-promoted click chemistry. *Nucl Med Biol* 2013;40:233-239.
39. Campbell-Verduyn LS, Mirfeizi L, Schoonen AK, Dierckx RA, Elsinga PH, Feringa BL. Strain-promoted copper-free "click" chemistry for 18F radiolabeling of bombesin. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50:11117-11120.
40. Sachin K, Jadhav VH, Kim EM, Kim HL, Lee SB, Jeong HJ, Lim ST, Sohn MH, Kim DW. F-18 Labeling protocol of peptides based on chemically orthogonal strain-promoted cycloaddition under physiologically friendly reaction conditions. *Bioconjug Chem* 2012;23:1680-1686.
41. Reiner T, Keliher EJ, Earley S, Marinelli B, Weissleder R. Synthesis and in vivo imaging of a 18F-labeled PARP1 inhibitor using a chemically orthogonal scavenger-assisted high-performance method. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50:1922-1925.
42. Ambrogio MW, Thomas CR, Zhao YL, Zink JI, Stoddart JF. Mechanized silica nanoparticles: a new frontier in theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res* 2011;44:903-913.
43. Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JI. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2012;41:2590-2605.
44. De la Zerda A, Zavaleta C, Keren S, Vaithilingam S, Bodapati S, Liu Z, Levi J, Smith BR, Ma TJ, Oralkan O, Cheng Z, Chen X, Dai H, Khuri-Yakub BT, Gambhir SS. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nat Nanotechnol* 2008;3:557-562.
45. Chou LY, Ming K, Chan WC. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev* 2011;40:233-245.
46. Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol* 2010;188:759-768.
47. Cheng Z, Zaki AA, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* 2012;338:903-910.
48. Rosenholm JM, Mamaeva V, Sahlgren C, Linden M. Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage. *Nanomedicine (Lond)* 2012;7:111-120.
49. Lee SB, Kim HL, Jeong HJ, Lim ST, Sohn MH, Kim DW. Mesoporous silica nanoparticle pretargeting for PET imaging based on a rapid bioorthogonal reaction in a living body. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52:10549-10552.