

点击化学/生物正交反应在药物开发中的应用进展

罗雅静, 孙建博*

中国药科大学中药学院, 江苏 南京

收稿日期: 2025年3月7日; 录用日期: 2025年3月18日; 发布日期: 2025年5月26日

摘要

点击化学(Click Chemistry)是由诺贝尔化学奖得主K. Barry Sharpless提出的一种高效模块化合成策略, 其特点是通过高选择性、高产率的化学反应快速构建复杂分子。生物正交反应(Bioorthogonal Chemistry)则由诺贝尔化学奖得主Carolyn R. Bertozzi开创, 特指在生物体系中进行的、不干扰正常生理过程的化学反应, 具有生物相容性好、选择性高等特点。这两种化学策略在药物开发中展现出独特优势: 点击化学提供了快速、灵活的分子构建方法, 而生物正交反应则实现了在复杂生物环境下的精准化学转化。本文将系统综述这两类反应的最新发展, 重点阐述其在药物分子设计、生物标记、药物递送等领域的创新应用, 并深入探讨当前面临的挑战及未来发展方向。

关键词

点击化学, 生物正交反应, 药物开发, 分子构建, 生物标记

Advances in the Application of Click Chemistry/Bioorthogonal Reactions in Drug Development

Yajing Luo, Jianbo Sun*

School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Mar. 7th, 2025; accepted: Mar. 18th, 2025; published: May 26th, 2025

Abstract

Click Chemistry, proposed by Nobel Chemistry Prize laureate K. Barry Sharpless, is an efficient mod-

*通讯作者。

ular synthesis strategy characterized by rapid construction of complex molecules through highly selective, high-yield chemical reactions. Bioorthogonal Chemistry, pioneered by Nobel Chemistry Prize laureate Carolyn R. Bertozzi, specifically refers to chemical reactions that occur in biological systems without interfering with normal physiological processes, featuring good biocompatibility and high selectivity. These two chemical strategies show unique advantages in drug development: Click Chemistry provides quick and flexible methods for molecular construction, while Bioorthogonal reactions enable precise chemical transformations in complex biological environments. This article systematically reviews the latest developments of these two types of reactions, focusing on their innovative applications in drug molecule design, biological labeling, and drug delivery, while also exploring current challenges and future development directions.

Keywords

Click Chemistry, Bioorthogonal Reactions, Drug Development, Molecular Construction, Biomarkers

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

点击化学(Click Chemistry)作为 21 世纪合成化学的革命性范式, 以其高效性和模块化特性重新定义了分子构建的边界。其核心理念是通过高选择性、高产率的化学反应, 实现复杂分子的精准组装[1]。这一策略不仅大幅简化了传统合成路径的繁琐步骤, 还推动了化学生物学与材料科学的深度交叉与融合。生物正交反应(Bioorthogonal Chemistry)作为点击化学的重要延伸, 通过设计在生命体系中正交(即不干扰正常生理过程)的化学反应, 实现了活细胞内生物分子的原位标记与动态追踪, 为揭示生命过程的分子机制提供了前所未有的时间与空间分辨率[2]。

点击化学和生物正交反应为药物开发和疾病诊断提供了全新的技术手段, 显著拓宽了研究与应用的边界。本文将系统梳理点击化学与生物正交反应的发展历程及其关键反应条件, 重点分析其在药物开发不同领域的应用现状与前景。同时, 本文将探讨当前这些技术在药物开发中的局限性, 并展望未来的突破方向。

2. 重要的点击化学/生物正交反应

2.1. CuAAC

铜催化的叠氮-炔烃环加成反应(Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC)是点击化学(Click Chemistry)中最具代表性的反应之一(如图 1), 由 Sharpless、Meldal 和 Fokin 团队于 2002 年独立开发。该反应因其高效性、选择性和广泛适用性, 成为合成 1,2,3-三唑类化合物的核心工具, 该反应的普遍反应产率在 90%, 完成反应的时间在 12~24 h 左右[3] [4]。

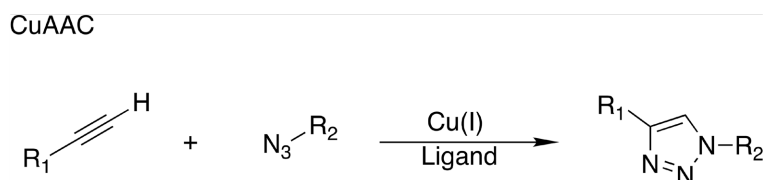


Figure 1. Copper-Catalyzed azide-alkyne cycloaddition

图 1. 铜催化的叠氮-炔烃环加成反应

2.2. SuFEx

基于 CuAAC 的基础上, Sharpless 团队进一步探索发现了无需金属催化剂, 高稳定性的硫氟交换的点击化学反应(Sulfur-Fluoride Exchange, SuFEx)。2014 年发表了以 SO_2F_2 气体作为磺酰氟给体的第一代硫氟交换反应, 受限 DBU 催化剂的使用, 该反应主要应用于聚合材料方面(如图 2) [5]。2017 年 Sharpless 进一步改良利用 SO_2F_2 气体与咪唑基团形成的盐, 作为一种稳定的磺酰氟基团给体[6]。这解决了 SO_2F_2 气体操作不便的问题, 结合后的磺酰氟基团反应活性也会大幅度提升, 可以直接与一级胺($-\text{NH}_2$)发生反应。六价的硫氟交换反应, 其核心是通过硫(VI)-氟键(如磺酰氟基团, $\text{R}-\text{SO}_2\text{F}$)与亲核试剂(如酚类、胺类等)之间的高效、选择性交换反应, 形成稳定的硫(VI)-氧键或硫(VI)-氮键化合物[7]。最近的研究利用氟磺酰氧基的 SuFEx 反应进行生物正交修饰, 展示了该类反应在除材料方面的应用外, 在药物开发领域的巨大潜力[8]。

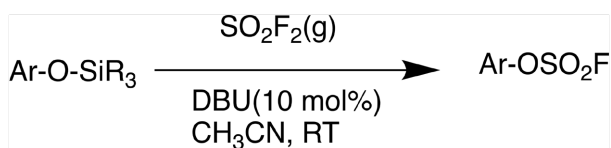


Figure 2. Sulfur-Fluoride exchange reaction

图 2. 硫 - 氟交换反应

2.3. SPAAC

2000 年, Bertozzi 课题组基于 Staudinger 还原反应而开发出 Staudinger 偶联反应, 即叠氮 - 膦基酯反应, 并将其用于细胞表面的化学修饰[9]。所需的膦易受空气氧化的影响, 优化以改善水溶性和提高反应速率在合成方面具有挑战性。随后 Bertozzi 课题组报告了叠氮化物和环辛炔衍生物的[3 + 2]环加成(Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)在没有辅助试剂的生理条件下非常容易发生(如图 3)。将该反应应用于活细胞的选择性化学修饰, 没有任何明显的毒性, 其二级速率常数为 $7.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 是 Staudinger 偶联反应的 17~63 倍[10]。

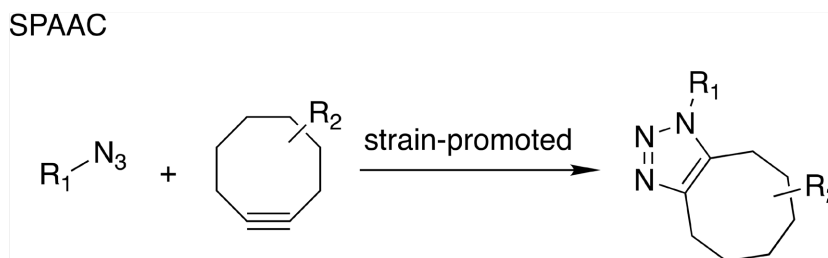


Figure 3. Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition

图 3. 环张力促进的叠氮化物 - 炔烃环加成反应

2.4. IEDDA

2008 年, FOX 及其同事发现了一种基于逆电子需求狄尔斯 - 阿尔德化学(Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reaction, IEDDA)的生物缀合新方法。该反应以非常快的速率, 其二阶速率常数为 2000 至 $22,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 这一类的生物正交反应也是目前已知最快的一类, 并耐受广泛的生物功能性(如图 4) [11]。这也使得 Fox 的逆 DA 反应的点击化学反应, 在活细胞成像, 疾病诊断方面成为最热门的方向之一。

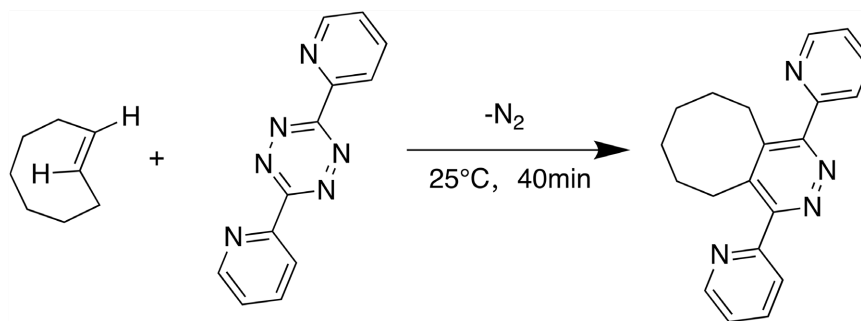


Figure 4. Inverse-Electron-Demand Diels-Alder reaction
图 4. 逆电子需求狄尔斯阿尔德反应

3. 点击化学/生物正交反应在药物开发中的重要作用

3.1. 点击化学/生物正交反应探针

基于点击化学/生物正交反应开发的探针在生物医学、分子成像和药物研发等领域展现出显著优势。通过点击反应将荧光基团或者放射性元素与肿瘤特异性配体偶联, 可以实现肿瘤组织的高效靶向成像。通过点击化学/生物正交反应将小分子、蛋白、聚糖与荧光基团连接, 可以实现不易检测分子的快速靶向成像[12]。西安电子科技大学王忠良教授团队开发的探针结合肿瘤特异性因子和荧光标记模块, 显著提升肿瘤检测的特异性[13]。2021 年北京大学陈兴团队开发了基于点击化学的膨胀显微成像技术(Click-ExM), Click-ExM 技术突破了传统光学衍射极限, 通过代谢标记和点击化学锚定生物分子, 首次实现对脂质、聚糖及小分子的超分辨成像, 且兼容多色标记和信号放大策略, 实最终现了超分辨显微成像[14]。2024 年 Dennis 课题组根据四嗪与反式环辛烯发生点击化学反应过程中荧光有“暗态到亮态”的特征, 首创了可视化检测细胞与细胞间相互作用的方法[15]。

点击化学/生物正交反应还可利用于特定蛋白质的标记。蛋白质与 AMP 的偶联(AMPylation)是人类细胞中普遍存在的一种翻译后修饰(PTM), 参与调节未折叠蛋白的反应和神经发育。Pavel Kielkowski 等人研发的一种 pro-N6azA 探针, 将 AMP 修饰后的蛋白质通过 SPAAC 点击化学进行生物素标记(如图 5), 随后进行荧光成像分析。该探针相比于以往研发的蛋白质 AMP 化探针, 其细胞渗透性更好, 因此可用于研究活细胞内的蛋白质 AMP 检测[16]。

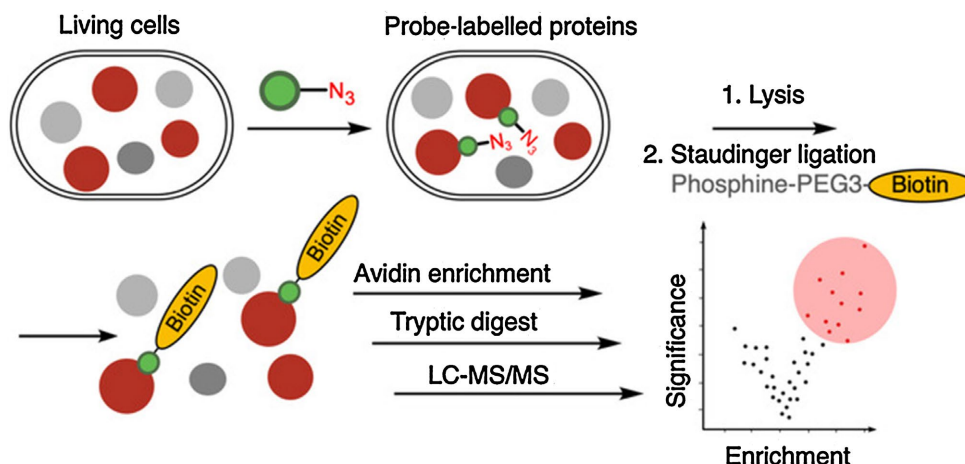


Figure 5. Schematic representation of chemical proteomic protocol
图 5. 化学蛋白质发光方案

点击化学/生物正交反应在分子成像上的发展, 进一步拓展了选择性的实现疾病诊断的新方法。浦侃裔教授团队报告了生物正交光学尿液检测(BOUT)的进展, 通过体内和体外生物正交混合检测将尿液相关基因的数量转换可读出的荧光信号。这种混合方法不仅保证了疾病检测的高特异性, 而且通过对尿液进行光学读出, 避免了光学成像中浅层组织穿透的问题[17]。

3.2. 点击化学/生物正交反应介导两个药效团的连接

点击化学反应作为连接元件, 连接两个药效团可以提升药物设计的灵活性与效率。模块化设计简化了合成步骤, 缩短了开发周期, 降低了成本。通过更换不同药效团或调整连接位点, 可快速筛选出活性最佳的组合, 加速候选药物的优化过程。还可以增强药物的靶向性, 一个药效团可设计为靶向单元(如抗体、多肽), 另一药效团为治疗单元(如毒素、化疗药物)。点击化学确保两者在特定位点精准偶联, 减少脱靶效应。

2017 年陈枢青等人开发了一种化学酶策略, 通过使用 Sortase A 酶为抗 CD20 单抗的 C 端修饰成寡聚甘氨酸-叠氮化物, 然后基于 SPAAC 叠氮炔环加成反应连接上有效载荷-环辛炔, 以产生均匀的偶联物(如图 6)。由 SPAAC 产生的抗体-药物偶联物完全保留了其抗原结合能力, 使用共聚焦显微镜观察被该偶联物被内化运输至溶酶体(如图 7), 在体内体外实验中以较好的效果释放有效载荷。该方法是一种具有很大灵活性的通用工具, 用于开发抗体-药物缀合物和蛋白质修饰[18]。

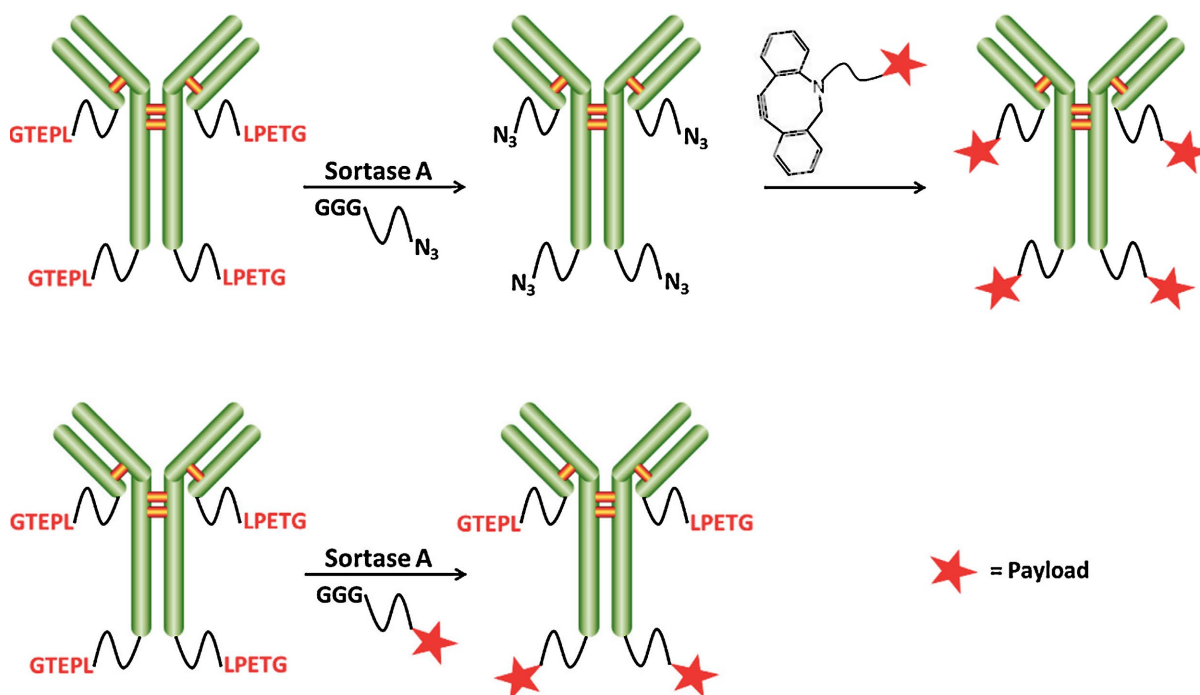


Figure 6. Schematic illustration of the two different strategies to generate homogeneous antibody-drugconjugates (ADCs)
图 6. 产生均质抗体药物缀合物(ADCs)的两种不同策略

除了作为抗体偶联物的连接元件, 点击化学与 PROTAC 技术结合也展现了良好前药递送效果。2016 年 Honorine Lebraud 等人以那度胺为 E3 泛素连接酶配体, JQ1 为 BRD4 配体, 通过反式环辛烯与四氮的点击化学反应实现细胞膜内的 PROTAC 自组装(如图 8) [19]。这种方法大大改善了高分子量带来的透膜性降低和有限的生物利用度, 并能有效降低影响 PROTAC 高浓度伴随的低效率“HOOK”效应。基于点

击化学与 PROTAC 技术开发的前药策略, 2025 年徐盛涛等人 RROTAC 的两部分用纳米脂质体包被, 引入了纳米点击形成的 PROTAC (Nano-CLIPTACs), 用于体内精确降解肿瘤蛋白。传统的高分子量 PROTAC 首先被分为两种较小的药物前体, 能够通过生物正交反应自组装成功能性 PROTAC。然后, 将最佳的 CLIPTACs 前体分别包裹在环状 RGDfC 肽修饰的脂质体中, 制备纳米 CLIPTACs, 实现肿瘤靶向递送和随后的原位自组装, 在肿瘤细胞内形成 PROTACs WZ42。使用关键的肿瘤靶点间变性淋巴瘤激酶(ALK)进一步验证了 Nano-CLIPTACs 在体外和体内的降解能力, 验证了该策略的安全性、有效性和“anti-hook” (如图 9) [20]。

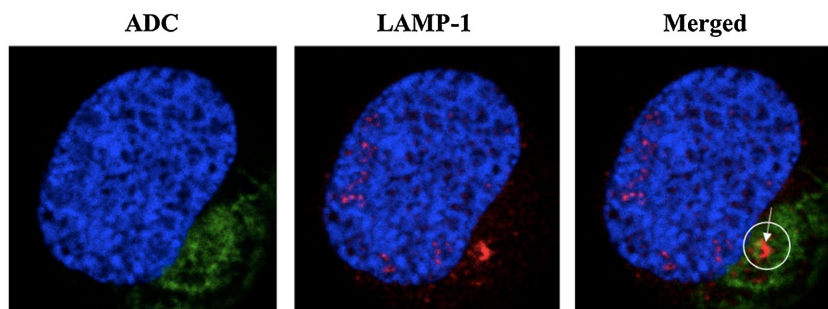


Figure 7. Trafficking and subcellular localization of OFA-GPN-vcMMAE.

图 7. OFA-GPN-vcMMAE 的运输和亚细胞定位

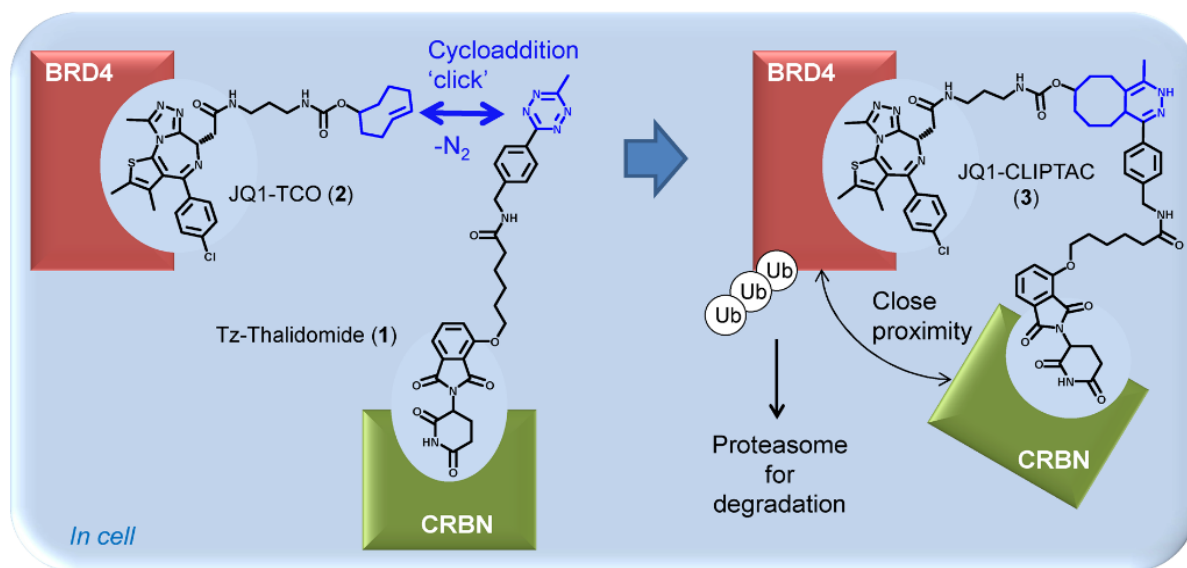


Figure 8. Representative scheme explaining the mode of action of click-formed PROTACs (CLIPTACs)

图 8. 点击形成的 PROTACs (CLIPTACs)作用模式

3.3. 点击反应/生物正交断裂反应靶向释放

生物正交断裂靶向释放通过结合生物正交反应与可控断裂机制实现了药物的精准释放, 该举措可以大大提升靶向性、提高药物稳定性与改善药物的副作用。2013 年, Robillard 课题组首次利用 IEDDA 反应实现反式环辛烯邻位氨基碳酸酯的定量释放, 并用阿霉素作为活性分子验证了该方法可作为良好的前药策略, 这一点击释放反应目前已发展成为重要生物正交化学工具[21]。2020 年该课题组对反式环辛烯触发断裂反应进行改良, 最终实现了四嗪触发的点击断裂反应。反式环辛烯由于环张力最多连接一个

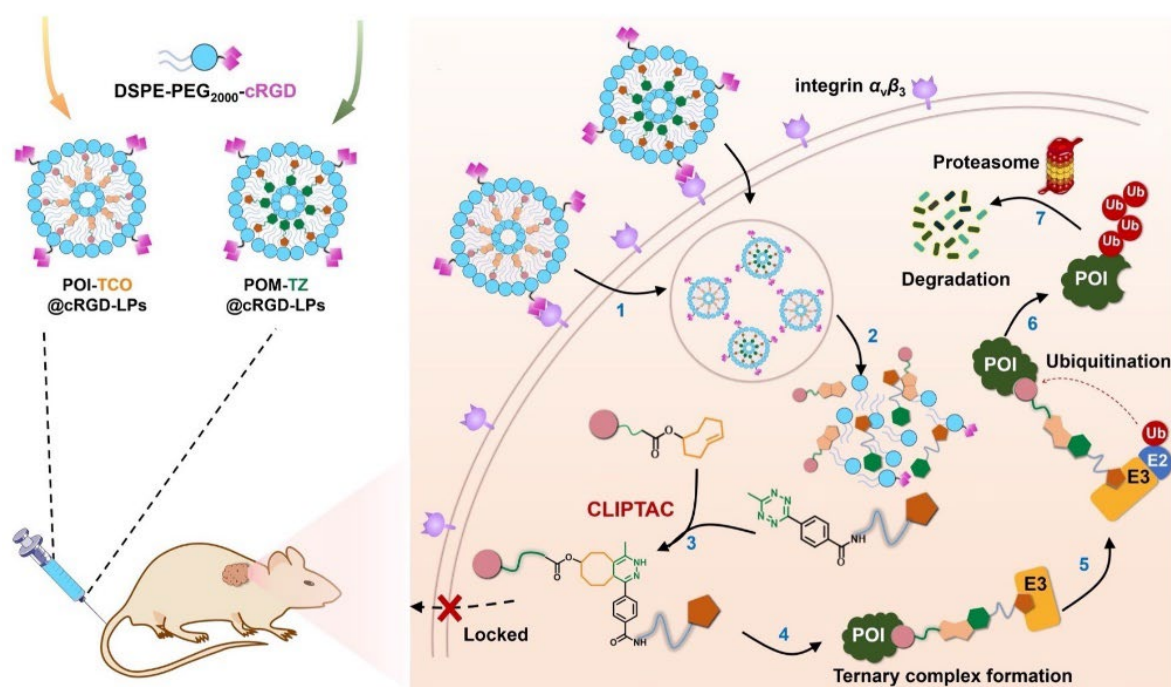


Figure 9. Schematic illustration of the Nano-CLIPTACs strategy for tumor specific protein degradation

图 9. 用于肿瘤特异性蛋白质降解的纳米 CLIPTACs 策略

支链, 这限制了该断裂反应在多细胞间的应用, 四嗪则不受环张力的限制, 使得多细胞多靶点的断裂反应成为可能[22]。2019 年刘志博课题组开发的新型生物正交反应, 构建了能在体内高效反应的苯基三氟硼酸脱硅响应片段, 实现药物的精准释放。该系统使药物能够在小鼠体内从抗体-药物偶联物中受控释放。当与纳米颗粒介导的递送结合时, Phe-BF₃ 催化的脱硅反应可以使纳米颗粒偶联物选择性地释放客户蛋白(如焦孔素)到小鼠的肿瘤细胞中[23]。2024 年 Jiraborrirak 等人通过四嗪与 2-反式环辛烯酯的点击释放反应, 在感染区域释放抗生素粘菌素, 该举措大大降低了粘菌素原有的肾毒性(如图 10) [24]。

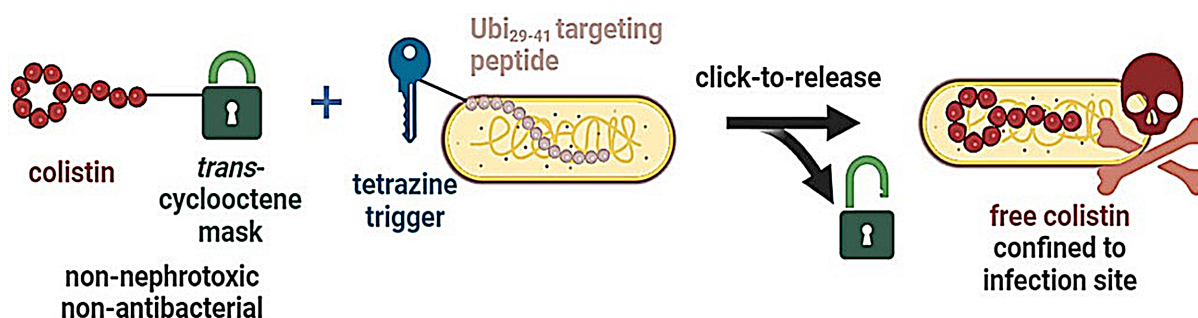


Figure 10. TCO derivatives activated by the tetrazine-appended, bacteria-targeting peptide ubiquicidin (29-41) via a click-to-release mechanism

图 10. TCO 衍生物通过点击释放机制被四嗪激活, 释放细菌靶向肽泛素

3.4. 点击反应介导三氮唑药物合成

叠氮化物-炔烃环加成反应能产生三氮唑结构, 三氮唑结构对水解、酶解和氧化具有高抗性, 适合在体内长期稳定存在。三氮唑结构的衍生物展现了多种药理活性, 能通过抑制细菌细胞色素 P450 酶起到

抗真菌效果[25] [26]; 通过干扰肿瘤细胞增殖、诱导凋亡或抑制关键酶发挥抗肿瘤效果[27] [28]; 通过干扰病毒复制起到抗病毒效果[29]。通过点击化学反应快速、高收率和高选择性地合成三氮唑结构, 能避免很多副反应。

2009 年 Colombano 等人通过铜催化的环加成反应快速合成了 185 个 NAD 合成抑制剂, 最优化合物细胞毒 IC_{50} 为 3.8 nM, NAD 消耗的 IC_{50} 为 3 nM, 展现出了良好的活性[30]。2009 年 Lee 等人利用点击化学反应, 以 GalNAc-N3 为聚糖组分与丙炔胺反应, 实现了一锅法合成新糖肽。该过程简易可行, 产率高, 开拓了糖肽合成的新方法[31]。

4. 点击化学/生物正交反应的局限与突破

点击化学/生物正交反应在药物开发中展现了巨大的潜力, 但其应用仍面临多重挑战。复杂的生理环境中(如低浓度、多干扰物), 在生物体内设计药物时, 用于有机合成的金属催化剂的潜在毒性是一个主要问题。通过铜(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成合成多种化合物是可能的, 但是在纯化后痕量铜仍可能以 ppm 水平保留在产物中, 这对于生物体内的实验设计来说是不可忍受的[32]。SPAAC 存在着反应速率的问题, 用环辛炔生物素标记已被叠氮化修饰的细胞, 实验结果显示给环辛炔浓度为在 10 μ M 时修饰效果不佳, 100 μ M 以上才能较好的连接上生物素。这说明了 SPAAC 在低浓度时反应速率并不快, 这大大影响了其实际应用[32]。人们寄予厚望的 IEDDA 反应速率很快, 生物相容度很高, 但其中的原料反式环辛烯的获取存在困难。反式构象的获得需要用硝酸银分布的硅胶截留顺式环辛烯在 254 nm 光异构化后产物, 其所需要的设备昂贵, 254 nm 光线人体直视容易致盲, 并且实验过程中需使用到大量的乙醚对人体健康有害。

点击化学/生物正交反应所面临的困难大部分集中在反应速率和合成难度方面。不断拓宽点击化学反应的类型, 发现高速率、高生物相容性、易合成的点击化学/生物正交反应将是未来其大规模应用的突破口。

5. 总结

点击化学已成为药物开发的“分子积木”, 显著加速了从靶点验证到临床候选药物的进程。未来随着新型反应、AI 技术及多学科交叉的推进, 其应用将进一步扩展到基因治疗、细胞疗法及智能药物递送等领域, 成为精准医学时代不可或缺的工具。目前点击化学中仍然存在少量反应对环境影响较大的问题(如高毒材料的使用)。需要加强绿色化学原则的运用, 如开发金属催化的无毒替代品或寻找更廉价、安全的非金属催化剂。未来可以重点结合材料科学与计算化学技术, 开发新型反应试剂和催化剂。例如, 在材料科学的帮助下, 设计具有高生物稳定性和环保特性的催化材料, 而通过 AI 技术优化点击反应路径, 将可能大幅降低实验费用、提高反应效率。此外, 将点击化学的模块化特性贯穿药物设计、筛选、修饰到临床测试的全过程, 可形成新型药物开发的“全链路式整合平台”。这种整合将避免传统线性开发模式的效率低下, 提升从分子设计到候选药物确认的整体速度。

参考文献

- [1] Oprea, I. and Smith, T.K. (2024) Click Chemistry Methodology: The Novel Paintbrush of Drug Design. *ACS Chemical Biology*, **20**, 19-32. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.4c00608>
- [2] McKay, C.S. and Finn, M.G. (2014) Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. *Chemistry & Biology*, **21**, 1075-1101. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.002>
- [3] Kolb, H.C., Finn, M.G. and Sharpless, K.B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, **40**, 2004-2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::aid-anie2004>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.0.co;2-5)
- [4] Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. and Sharpless, K.B. (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process:

- Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, **41**, 2596-2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4)
- [5] Dong, J., Sharpless, K.B., Kwisnek, L., Oakdale, J.S. and Fokin, V.V. (2014) SuFEx-Based Synthesis of Polysulfates. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 9466-9470. <https://doi.org/10.1002/anie.201403758>
- [6] Della Sala, F., Maiti, S., Bonanni, A., Scrimin, P. and Prins, L.J. (2018) Fuel-Selective Transient Activation of Nanosystems for Signal Generation. *Angewandte Chemie International Edition*, **57**, 1611-1615. <https://doi.org/10.1002/anie.201711964>
- [7] Dong, J., Krasnova, L., Finn, M.G. and Sharpless, K.B. (2014) Sulfur (VI) Fluoride Exchange (SuFEx): Another Good Reaction for Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 9430-9448. <https://doi.org/10.1002/anie.201309399>
- [8] Chen, W., Dong, J., Plate, L., Mortenson, D.E., Brighty, G.J., Li, S., *et al.* (2016) Arylfluorosulfates Inactivate Intracellular Lipid Binding Protein(s) through Chemoselective Sufex Reaction with a Binding Site Tyr Residue. *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 7353-7364. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02960>
- [9] Baskin, J.M. and Bertozzi, C.R. (2007) Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial Science*, **26**, 1211-1219. <https://doi.org/10.1002/qsar.200740086>
- [10] Agard, N.J., Prescher, J.A. and Bertozzi, C.R. (2004) A Strain-Promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 15046-15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>
- [11] Blackman, M.L., Royzen, M. and Fox, J.M. (2008) Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 13518-13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>
- [12] Devaraj, N.K., Upadhyay, R., Haun, J.B., Hilderbrand, S.A. and Weissleder, R. (2009) Fast and Sensitive Pretargeted Labeling of Cancer Cells through a Tetrazine/Trans-Cyclooctene Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition*, **48**, 7013-7016. <https://doi.org/10.1002/anie.200903233>
- [13] Jia, Q., Zhang, R., Yan, H., Feng, Y., Sun, F., Yang, Z., *et al.* (2023) An Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe for Precise Detection of the Pulmonary Metastatic Tumors: A Traditional Molecule Having a Stunning Turn. *Angewandte Chemie International Edition*, **62**, e202313420. <https://doi.org/10.1002/anie.202313420>
- [14] Sun, D., Fan, X., Shi, Y., Zhang, H., Huang, Z., Cheng, B., *et al.* (2020) Click-ExM Enables Expansion Microscopy for All Biomolecules. *Nature Methods*, **18**, 107-113. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01005-2>
- [15] Xue, E.Y., Lee, A.C.K., Chow, K.T. and Ng, D.K.P. (2024) Promotion and Detection of Cell-Cell Interactions through a Bioorthogonal Approach. *Journal of the American Chemical Society*, **146**, 17334-17347. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c04317>
- [16] Kielkowski, P., Buchsbaum, I.Y., Becker, T., Bach, K., Cappello, S. and Sieber, S.A. (2020) A Pronucleotide Probe for Live-Cell Imaging of Protein Ampylation. *ChemBioChem*, **21**, 1285-1287. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900716>
- [17] Cheng, P., Zeng, Z., Liu, J., Liew, S.S., Hu, Y., Xu, M., *et al.* (2025) Urinary Bioorthogonal Reporters for the Monitoring of the Efficacy of Chemotherapy for Lung Cancer and of Associated Kidney Injury. *Nature Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1038/s41551-024-01340-1>
- [18] Pan, L., Zhao, W., Lai, J., Ding, D., Zhang, Q., Yang, X., *et al.* (2016) Sortase A-Generated Highly Potent Anti-CD20-MMAE Conjugates for Efficient Elimination of B-Lineage Lymphomas. *Small*, **13**, Article 1602267. <https://doi.org/10.1002/sml.201602267>
- [19] Lebraud, H., Wright, D.J., Johnson, C.N. and Heightman, T.D. (2016) Protein Degradation by In-Cell Self-Assembly of Proteolysis Targeting Chimeras. *ACS Central Science*, **2**, 927-934. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00280>
- [20] Xie, S., Zhu, J., Peng, Y., Zhan, F., Zhan, F., He, C., *et al.* (2025) *In Vivo* Self-Assembly of Protacs by Bioorthogonal Chemistry for Precision Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, **64**, e202421713. <https://doi.org/10.1002/anie.202421713>
- [21] Versteegen, R.M., Rossin, R., ten Hoeve, W., Janssen, H.M. and Robillard, M.S. (2013) Click to Release: Instantaneous Doxorubicin Elimination Upon Tetrazine Ligation. *Angewandte Chemie International Edition*, **52**, 14112-14116. <https://doi.org/10.1002/anie.201305969>
- [22] van Onzen, A.H.A.M., Versteegen, R.M., Hoebe, F.J.M., Pilot, I.A.W., Rossin, R., Zhu, T., *et al.* (2020) Bioorthogonal Tetrazine Carbamate Cleavage by Highly Reactive Trans-Cyclooctene. *Journal of the American Chemical Society*, **142**, 10955-10963. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00531>
- [23] Wang, Q., Wang, Y., Ding, J., Wang, C., Zhou, X., Gao, W., *et al.* (2020) A Bioorthogonal System Reveals Antitumour Immune Function of Pyroptosis. *Nature*, **579**, 421-426. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2079-1>
- [24] Charoenpattarapreeda, J., Tegge, W., Xu, C., Harmrolfs, K., Hinkelmann, B., Wullenkord, H., *et al.* (2024) A Targeted

- Click-to-Release Activation of the Last-Resort Antibiotic Colistin Reduces Its Renal Cell Toxicity. *Angewandte Chemie International Edition*, **63**, e202408360. <https://doi.org/10.1002/anie.202408360>
- [25] Geisler, J., Helle, H., Ekse, D., Duong, N.K., Evans, D.B., Nordbø, Y., *et al.* (2008) Letrozole Is Superior to Anastrozole in Suppressing Breast Cancer Tissue and Plasma Estrogen Levels. *Clinical Cancer Research*, **14**, 6330-6335. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-5221>
- [26] Bayrak, H., Demirbas, A., Demirbas, N. and Karaoglu, S.A. (2009) Synthesis of Some New 1,2,4-Triazoles Starting from Isonicotinic Acid Hydrazide and Evaluation of Their Antimicrobial Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 4362-4366. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.022>
- [27] Xu, Z., Zhao, S. and Liu, Y. (2019) 1,2,3-Triazole-Containing Hybrids as Potential Anticancer Agents: Current Developments, Action Mechanisms and Structure-Activity Relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **183**, Article 111700. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111700>
- [28] Kamal, A., Prabhakar, S., Janaki Ramaiah, M., Venkat Reddy, P., Ratna Reddy, C., Mallareddy, A., *et al.* (2011) Synthesis and Anticancer Activity of Chalcone-Pyrrolobenzodiazepine Conjugates Linked via 1,2,3-Triazole Ring Side-Armed with Alkane Spacers. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 3820-3831. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.050>
- [29] Küçükgülzel, Ş.G. and Çıkla-Süzgün, P. (2015) Recent Advances Bioactive 1,2,4-Triazole-3-Thiones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 830-870. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.033>
- [30] Colombano, G., Travelli, C., Galli, U., Caldarelli, A., Chini, M.G., Canonico, P.L., *et al.* (2009) A Novel Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor Synthesized via Click Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 616-623. <https://doi.org/10.1021/jm9010669>
- [31] Lee, D.J., Mandal, K., Harris, P.W.R., Brimble, M.A. and Kent, S.B.H. (2009) A One-Pot Approach to Neoglycopeptides Using Orthogonal Native Chemical Ligation and Click Chemistry. *Organic Letters*, **11**, 5270-5273. <https://doi.org/10.1021/ol902131n>
- [32] Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., *et al.* (2007) Copper-Free Click Chemistry for Dynamic *in Vivo* Imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 16793-16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>