硅硼酸酯的设计、合成及其生物正交激活氮氧化物前药的活性研究

焦国峰[1,2#], 张静芬[1,2#], 闵庆强[1,2*], 季兴跃[1,2*]

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215021; 2. 江苏省抗体靶向药物研究重点实验室, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222047)

摘要: 本实验室前期发现的硅硼酸酯类化合物可通过生物正交剪切反应激活氮氧化物前药。生物正交剪切反应的速率常数是该前药体内转化的关键参数, 本文通过对硅硼酸酯进行结构优化, 以获得具有更高二级反应速率常数的衍生物, 从而提高氮氧化物前药的激活效率。实验结果表明, 在硅苄基的苯环上引入吸电子基团等结构修饰可显著提升剪切反应速率, 并成功筛选出多个具有快速反应动力学 ($k_2 > 10^2$ L·mol^{-1}·s^{-1}) 的硅硼酸酯衍生物。其中一个代表性硅硼酸酯 **2b** (k_2 = 239 L·mol^{-1}·s^{-1}) 能够在细胞水平上, 高效特异地实现氮氧化物类荧光探针及他莫昔芬前药的激活。综上, 本研究为生物正交前药的设计及体内应用提供了高效的剪切反应工具。

关键词: 生物正交剪切反应; 硅硼酸酯; 氮氧化物; 前药

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)07-2567-10

Design, synthesis of silylboranes and their bioorthogonal activation of *N*-oxide prodrugs

JIAO Guo-feng[1,2#], ZHANG Jing-fen[1,2#], MIN Qing-qiang[1,2*], JI Xing-yue[1,2*]

(*1. College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215021, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Antibody-Targeted Drug Research, Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., Lianyungang 222047, China*)

Abstract: The rate constant of the bioorthogonal cleavage reaction is a critical parameter for its *in vivo* translation and application. Building upon the bioorthogonal decaging chemistry of silylborane and N-oxide, this study conducted structural optimization toward silylborane to obtain derivatives with higher second-order rate constants. The structure-reactivity relationships studies revealed that introducing electron-withdrawing groups onto the phenyl ring of the silylbenzyl moiety significantly enhanced the cleavage reaction rate. Furthermore, several silylboranes were successfully identified with fast reaction kinetics ($k_2 > 10^2$ L·mol^{-1}·s^{-1}). A representative derivative **2b** (k_2 = 239 L·mol^{-1}·s^{-1}) was able to efficiently and specifically activate the N-oxide based fluorescent probe and prodrug of tamoxifen at the cellular level. In summary, this work provides an efficient cleavage reaction tool for the design of bioorthogonal prodrugs for *in vivo* applications.

Key words: bioorthogonal bond-cleavage reaction; silylborane; *N*-oxide; prodrug

近年来, 生物正交剪切反应凭借其在生命体系中表现出的高度选择性和良好的生物兼容性, 在生物医药领域获得了广泛应用[1-7]。特别是在药物激活方面, 基于生物正交剪切反应开发的前药 (生物正交前药) 能够实现药物在特定时间和空间上的精准释放, 在肿瘤靶向化疗药物递送中展现出巨大潜力。过去十余年间, 国内外的研究人员报道了多种基于生物正交反应的前药体系, 并在临床前动物模型中实现了药物的按

收稿日期: 2025-10-10; 修回日期: 2026-03-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82574375, 22277087, 22507085); 苏州大学苏州医学院−齐鲁医学研究基金项目 (24QL201102); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: qqmin@suda.edu.cn; jixy@suda.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1191

需可控激活释放[8-28]。其中, 基于四嗪与反式环辛烯反应的前药已完成临床I期研究并进入II期研究阶段, 标志着该领域的重要突破[29,30]。

尽管该领域已取得显著进展, 仍面临若干关键技术瓶颈[31]。首先, 生物正交前药的体内激活需克服代谢反应的竞争, 要求所涉及的生物正交剪切反应必须具备快速的反应动力学 (通常二级速率常数 $k_2 > 10^2$ L·mol^{-1}·s^{-1})。然而, 尽管已报道多种生物正交前药体系, 其剪切反应动力学大多较慢, 难以有效用于体内激活释放。其次, 生物正交前药的激活通常涉及“点击 (click)”和“释放 (release)”两步反应, 两步反应的动力学共同决定了药物激活释放的效率[32,33]。但研究发现, click反应的动力学与释放步骤的动力学之间缺乏相关性, 在某些情况下甚至存在负相关关系。例如在四嗪与反式烯烃的前药体系中, click反应快的四嗪往往不能有效激活前药释放[21,22,34]。最后, 为实现药物在体内的高效激活释放, click反应试剂需具备理想的药代动力学性质。然而, 尽管四嗪与反式烯烃的反应被广泛用于体内前药激活, 现有报道的四嗪类试剂普遍存在体内清除过快的问题 (半衰期通常仅数分钟), 常需高剂量给药才能有效实现药物释放, 而这可能带来潜在的毒不良反应[35]。因此, 开发具有快速反应动力学的新型生物正交剪切反应仍具有重要的科学意义。

本课题组长期致力于新型生物正交剪切反应的开发[36-39]。前期研究中, 作者基于氮氧化物与硼酸酯的氧化还原反应, 提出采用硅硼酸酯替代硼酸酯的策略, 显著提升了其与氮氧化物的反应速率 (提升约一百万倍, $k_2 > 10^2$ L·mol^{-1}·s^{-1}), 并成功应用于体内前药激活释放[36]。相较于其他生物正交剪切反应, 氮氧化物与硅硼酸酯组成的反应对, 不仅具有快速的反应动力学与高效剪切效率, 而且相应试剂具有良好的稳定性。本文旨在前期工作基础上, 对硅硼酸酯进行结构优化, 以期进一步提高其与氮氧化物的反应动力学, 总结相应的构效关系, 并研究了溶剂效应对于该生物正交剪切反应的影响。此外, 本研究还设计并合成了一种他莫昔芬氮氧化物前药, 并利用硅硼酸酯在细胞水平上实现了其抗增殖活性的按需激活, 验证了该策略的可行性 (图1)。

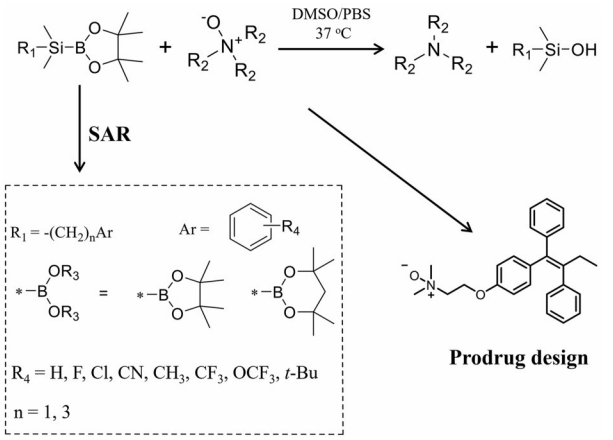


Figure 1 Main research content of this paper: Structural optimization towards silylboranes and design of *N*-oxide-based prodrug

结果与讨论

1 结构−反应活性关系研究

前期研究表明, 硅硼酸酯侧链的芳环结构对反应动力学具有显著的促进作用[36]。因此, 本文主要研究芳环上不同取代基对反应动力学的影响; 此外, 还将考察苄位引入甲基或插入亚甲基, 及不同硼酸酯取代基对反应动力学的作用。硅硼酸酯 (**2a**～**2s**) 的合成路线如图2所示。以市售或合成的硅烷 (**2a-1**～**2s-1**) 为原料, 在Pt/C催化下与双硼酸酯发生偶联反应, 即得目标产物。为研究硅硼酸酯与*N*-氧化物的点击 (click) 反应动力学, 本文设计并合成了氮氧化胺基香豆素探针分子**1b**。由于氮氧官能团的引入, **1b**的荧光性质被显著淬灭。当其与硅硼酸酯发生剪切反应生成产物**1a**时, 荧光得以恢复。因此, 通过监测450 nm处荧光强度的变化可实时追踪反应进程, 从而高效测定相应的二级反应动力学常数。

在合成上述衍生物后, 本文于50% CH_3CN/PBS (pH = 7.4) 溶液中测定了硅硼酸酯与氮氧化物探针**1b**的二级反应动力学常数 (表1), 在苄位引入甲基 (化合物**2a** *vs* **2d**) 后, 其与**1b**的反应速率常数降低, 这可能源于位阻效应。当碳链延长 (化合物**2c**) 时, 反应速率常数也有所下降。作者前期研究[36]发现, 苯环的引入可通过与**1b**形成*π*-*π*堆积相互作用, 降低过渡态活化能, 从而加速反应。碳链延长可能削弱了**2c**的苯环与**1b**芳环间的*π*-*π*堆积作用, 导致反应活性降低。随后, 对**2a**的硼酸酯片段进行修饰, 合成了化合物**2b**。令人惊喜的是, **2b**与**1b**的反应速率常数较**2a**提高了约4倍。相较于**1b**, **2b**仅通过在硼酸酯片段中插入一个亚甲基, 使硼酸酯由五元环转变为六元环。这一细微的结构变化可能降低了硼原子的空间位阻, 从而显著加快了其与氮氧化物之间的剪切反应速率。

本文进一步考察了苯环取代基的影响 (表1)。引入吸电子基团 (如氰基、三氟甲基、卤素) 时, 相应衍生物与**1b**的反应速率常数均增加; 而给电子基团 (如甲基、叔丁基) 则降低反应活性。取代基对反应活性的影响趋势可归纳为: -CN > -CF_3 > -Cl、-F、-OCF_3 > -Me/

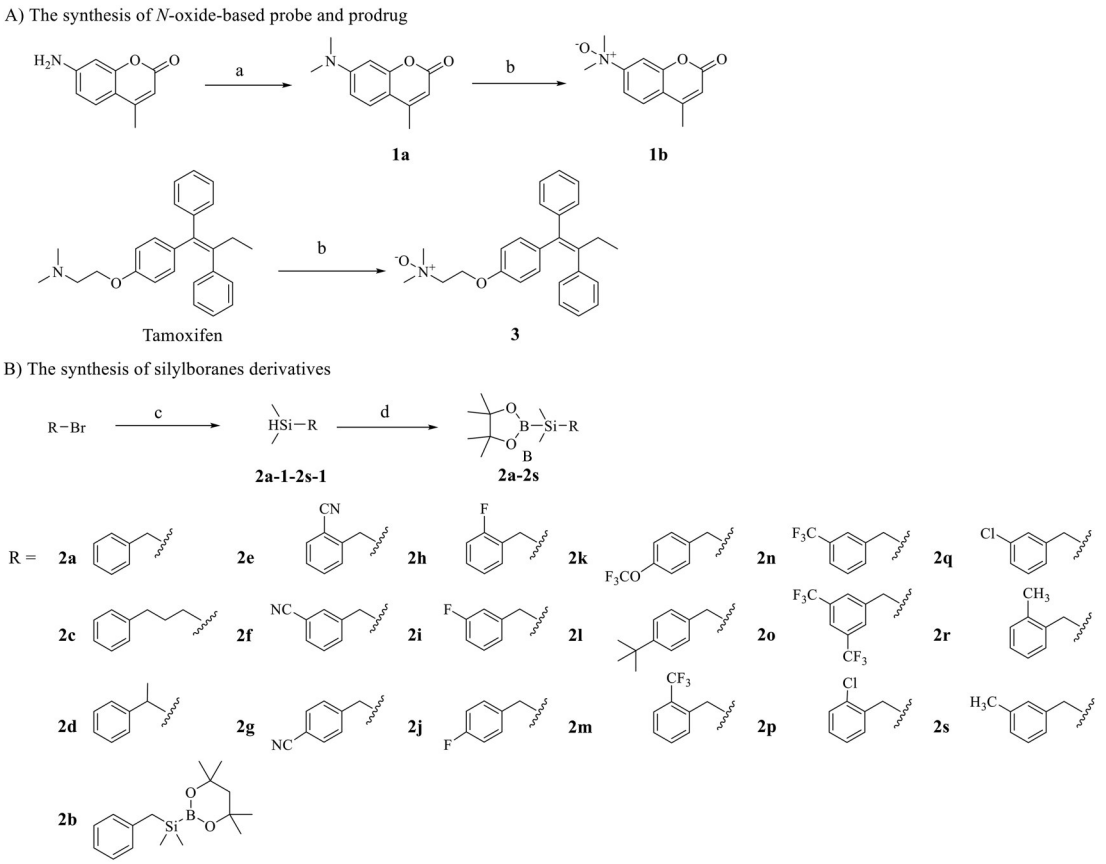


Figure 2 Synthetic route of the final products. Reaction conditions, a: MeI, K_2CO_3, DMF, 60 ℃, 6 h; b: *m*-CPBA, DCM, 0 ℃, 2 h; c: Mg, Me_2SiHCl, I_2, dry THF, N_2, 60 ℃, reflux, 2 h; d: Bis(2, 4-dimethylpentane-2, 4-glycolato) diboron/bis (pinacolato) diboron, Pt/C (5%), cyclohexane, 80 ℃, 24 h

t-Bu。值得注意的是, 双三氟甲基取代衍生物 (**2o**) 的反应活性显著高于单取代衍生物 (**2m**、**2n**)。前期计算研究表明, 该反应的限速步骤是N-O键对硼原子的亲核加成。吸电子基团可能通过诱导效应降低硅原子电子云密度, 进而增强硼原子的路易斯酸性, 使其更易与氮氧化物发生加成, 从而加快反应速率。

综上, 通过结构优化, 本文获得了反应活性显著提升的硅硼酸酯衍生物, 特别是 **2b**、**2e**～**g**、**2m**～**o**, 其与 **1b** 的二级反应速率常数均大于 10^2 L·mol^{-1}·s^{-1}。该速率常数高于多数已报道的点击化学反应, 表明该体系具备应用于复杂生物体系的潜力。

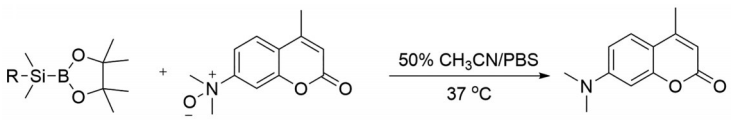
2 氮氧化物与硅硼酸酯剪切反应的溶剂效应研究

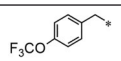
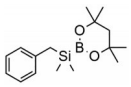
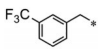
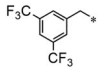
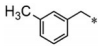
通常情况下, 点击反应在水相中的速率显著高于有机相, 这主要归因于反应物间的疏水相互作用。因此, 本文亦研究了水相比例对硅硼酸酯与N-氧化物剪切反应速率的影响。结果如图3所示: 出乎意料的是, **2a** 与 **1b** 在纯有机相中反应极快, 二级速率常数 k_2 高达 5×10^4 L·mol^{-1}·s^{-1}。随着PBS比例增加, k_2 值急剧下降。然而, 当PBS比例从60%增至75%～90%时, k_2 值又呈现上升趋势。反应速率常数与水相比例之间的这种U型关系表明, 至少存在两个关键因素影响该剪切反应动力学, 且其主导作用随水相比例变化而转换。具体而言, 本实验室前期研究已证实, 水的引入会导致反应速率常数急剧下降, 其机制在于氢氧根离子 (OH^-) 与硼原子结合形成四面体硼酸根阴离子, 空间位阻效应阻碍了N-O键对硼原子的亲核加成 (图3), 从而导致反应显著减慢。然而, 当水相比例超过某一临界值 (约60%) 后, 反应物间的疏水相互作用对反应速率的促进作用开始占据主导地位, 致使速率常数重新升高 (图3)。

3 氮氧化物前药激活研究

完成硅硼酸酯结构优化与反应动力学筛选后, 本文选取具有较快反应速率的化合物 **2b**, 初步评估其与探针 **1b** 剪切反应的生物相容性。首先, 通过细胞毒性实验测定了 **2b** 对 A549 细胞增殖的半数抑制浓度 (IC_{50})。如图4A所示, 经 200 μmol·L^{-1} **2b** 处理 24 h 后, A549细胞存活率仍达92%以上, 表明该化合物具有良好的生物相容性。随后, 利用化合物 **1b** 在反应前后荧

Table 1 The second-order reaction rate constants of silylboranes with *N*-oxide. *The rate constant was measured in 50% CH_3CN/PBS (pH = 7.4) at room temperature



Compound	R	k_2/L·mol^{-1}·s^{-1} *	Compound	R	k_2/L·mol^{-1}·s^{-1} *
2a		54.0	**2k**		77.2
2b		239.2	**2l**		36.7
2c		30.3	**2m**		164.9
2d		18.0	**2n**		135.9
2e		198.4	**2o**		234.0
2f		243.9	**2p**		87.7
2g		174.1	**2q**		83.4
2h		70.6	**2r**		44.2
2i		61.0	**2s**		24.6
2j		37.7			

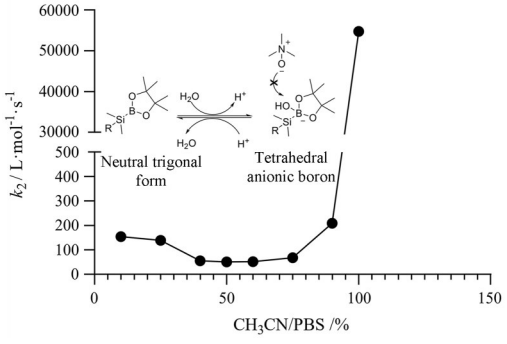


Figure 3 Effects of the water ratio on the cleavage rate constant of **1b** with **2a** (T = 25 ℃)

光性质的差异, 在A549细胞内进行了荧光成像研究。结果如图4B所示: 仅用**1b**处理的对照组未检测到明显荧光信号, 表明**1b**在胞内环境中稳定性良好, 未被内源性酶或代谢物还原为叔胺; 而**2b**与**1b**共处理的细胞则显示出显著的蓝色荧光信号。综上, 上述结果证实硅硼酸酯与氮氧化物的剪切反应能在活细胞环境中高效、特异地发生。

基于以上实验结果, 本研究进一步设计合成了基于氮氧化物的他莫昔芬前药。他莫昔芬是治疗乳腺癌的关键药物, 其结构中的叔胺官能团可通过一步氧

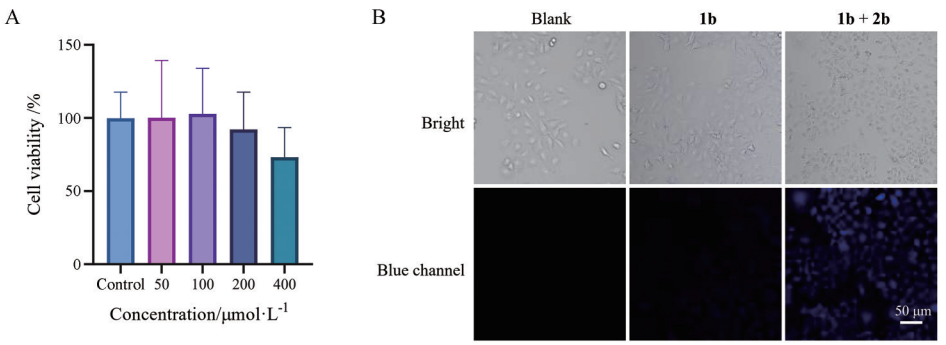


Figure 4 Cellular imaging studies using silylboranes and an *N*-oxide probe. A: Cytotoxicity of borosilicate ester **2b** in A549 cells (24 h); B: Imaging of A549 cells treated with borosilicate ester **2b** (80 μmol·L^{-1}) and nitroxide probe **1b** (10 μmol·L^{-1}). Scale bar = 50 μm

化反应顺利转化为相应的氮氧化物前药**3**。HPLC分析表明, 在PBS溶液中, 化合物**3**可被硅硼酸酯**2b**高效激活, 生成他莫昔芬 (图5A)。随后, 在前药**3**与**2b**联合作用下, 于小鼠乳腺癌细胞4T1中评估了其抗增殖活性。结果如图5B所示, 他莫昔芬前药**3**及**2b** (100 μmol·L^{-1}) 在测试浓度下未显示任何抗增殖活性, 说明氮氧化物修饰可有效屏蔽他莫昔芬的活性。正如预期, 硅硼酸酯**2b**能够显著恢复前药**3**的抗增殖效果, 其活性与阳性对照他莫昔芬相当, 表明**2b**在真实细胞环境中可有效激活氮氧化物前药。

结论

生物正交剪切反应的速率常数是其体内转化应用的关键参数, 开发具有快速反应动力学的生物正交体系具有重要意义。本文基于课题组前期发现的硅硼酸酯–氮氧化物生物正交剪切反应, 对硅硼酸酯进行了初步结构修饰, 筛选出多个反应速率显著提升 (k_2 > 10^2 L·mol^{-1}·s^{-1}) 的候选化合物, 并总结了相应的构效关系。此外, 在细胞水平初步验证了新合成硅硼酸酯衍生物激活氮氧化物探针和前药的有效性。本工作为基于该体系设计生物正交前药及推进其体内应用奠定了重要基础。

实验部分

液体超导核磁共振谱仪 (AVANCE NEO300/400/600 MHz, 美国布鲁克公司); 高效液相色谱系统 (LC-20AT, 日本岛津制作所); 电喷雾离子源高分辨质谱仪 (Xevo G2-XS Tof, 英国沃特世公司); 紫外–可见分光光度计 (UV2600, 日本岛津制作所); 荧光分光光度检测装置 (F-320, 中国天津港东科技); CO_2恒温细胞培养箱 (HF151, 力康生物医疗科技控股有限公司); 荧光倒置研究显微镜 (TS2R-FL, 日本尼康公司)。

1 化合物的合成

1.1 中间体1a的合成方法[36]

取4-甲基-7-氨基香豆素 (0.799 mmol, 1.0 equiv.) 溶解于4 mL *N*,*N*-二甲基甲酰胺溶剂中, 随后加入无水碳酸钾 (3.196 mmol, 4.0 equiv.), 在25 ℃条件下持续搅拌。将碘甲烷 (6.392 mmol, 8.0 equiv.) 缓慢滴加到反应体系中, 随后将温度升至60 ℃反应6 h, 期间采用TLC监测反应进程。反应完成后, 将反应液冷却至25 ℃, 加入去离子水并用乙酸乙酯进行三次萃取 (每次20 mL)。合并有机层后, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。所得粗产物通过硅胶柱色谱进行纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯 = 5∶1), 最终获得86 mg淡黄色粉末状产物, 收率40.4%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.40～7.42 (m, 1H), 6.68～6.57 (m, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.05 (s, 6H), 2.34 (s, 3H)。

1.2 化合物1b的合成方法[36]

取中间体**1a** (0.294 mmol, 1.0 equiv.) 溶解于2 mL二氯甲烷溶剂中, 冰浴冷却至0 ℃。在搅拌条件下, 缓慢加入间氯过氧苯甲酸 (0.441 mmol, 1.5 equiv.), 低温反应2 h, 期间通过TLC跟踪反应进程。反应完成后, 减压浓缩, 所得粗产物经硅胶柱色谱纯化, 最终获得淡黄色结晶产物。粉末55 mg (洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇 = 10∶1), 收率85%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8.05 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.73 (d, J = 6 Hz,

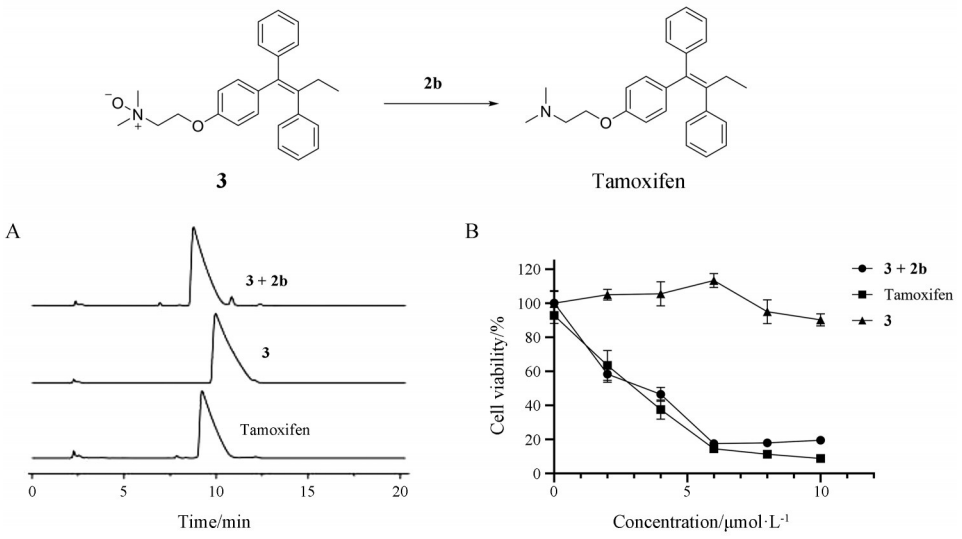


Figure 5 Activation of an *N*-oxide-based tamoxifen prodrug by silylborane. A: The HPLC traces of the reaction between **2b** (500 μmol·L^{-1}) and prodrug **3** (100 μmol·L^{-1}) in 20% CH_3CN/PBS (pH = 7.4) after 5 min; B: The anti-proliferative activity of silylborane **2b** (100 μmol·L^{-1}) with tamoxifen prodrug **3** in 4T1 cells (24 h)

1H), 6.37 (s, 1H), 3.64 (s, 6H), 2.47 (s, 3H)。

1.3 硅烷中间体2c-1～2s-1的合成方法

在氮气保护下, 首先将活化后的镁粉 (385.7 mg, 15.87 mmol, 3.0 equiv.) 加入5 mL无水四氢呋喃溶剂中, 随后加入两粒碘单质作为催化剂。将二甲基氯硅烷 (1.75 g, 18.52 mmol, 3.5 equiv.) 的四氢呋喃溶液缓慢滴加至上述反应混合液中, 于40 ℃条件下搅拌2 min。然后加入苄基卤化物 (5.29 mmol, 1.0 equiv.), 升温至60 ℃回流反应2 h, 期间采用TLC跟踪反应进程。反应完成后, 冷却至25 ℃, 加入5 mL正己烷等倍稀释反应混合液, 经硅藻土垫层过滤, 滤液减压浓缩。所得粗产物通过硅胶柱色谱纯化 (石油醚为洗脱剂), 最终获得目标二甲基硅烷衍生物。

1.3.1 二甲基(3-苯丙基)硅烷 (2c-1) 无色油状, 产率91%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.37～7.33 (m, 2H), 7.19～7.17 (m, 3H), 3.72 (s, 1H), 2.62 (t, J = 6 Hz, 2H), 1.71～1.57 (m, 2H), 0.62 (d, J = 6 Hz, 2H), 0.02 (s, 6H)。

1.3.2 2-((二甲基硅基)甲基)苯甲腈 (2e-1) 无色油状, 产率89%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.58～7.44 (m, 1H), 7.44～7.42 (m, 1H), 7.22～7.18 (m, 2H), 4.01 (s, 1H), 2.46 (s, 2H), 0.13 (s, 6H)。

1.3.3 3-((二甲基硅基)甲基)苯甲腈 (2f-1) 无色油状, 产率86%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.38～7.32 (m, 2H), 7.32～7.26 (m, 2H), 3.95 (s, 1H), 2.20 (s, 2H), 0.08 (s, 6H)。

1.3.4 (2-氟苯基)二甲基硅烷 (2h-1) 无色油状, 产率93%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.20～7.04 (m, 4H), 3.97 (s, 1H), 2.17 (s, 2H), 0.09 (s, 6H)。

1.3.5 (3-氟苯基)二甲基硅烷 (2i-1) 无色油状, 产率92%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.20～7.06 (m, 1H), 6.79～6.72 (m, 3H), 3.95 (s, 1H), 2.15 (s, 2H), 0.07 (s, 6H)。

1.3.6 (4-(二氟(氟基)甲基)苄基)二甲基硅烷 (2k-1) 无色油状, 产率90%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.06～7.05 (m, 4H), 3.94 (s, 1H), 2.16 (s, 2H), 0.07 (s, 6H)。

1.3.7 (3,5-双(三氟甲基)苄基)二甲基硅烷 (2o-1) 无色油状, 产率91%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.61～7.60 (m, 1H), 7.47～7.45 (m, 2H), 3.98 (s, 1H), 2.31 (s, 2H), 0.10 (s, 6H)。

1.3.8 (3-氯苯基)二甲基硅烷 (2q-1) 无色油状, 产率85%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.14～6.90 (m, 4H), 3.94 (s, 1H), 2.13 (s, 2H), 0.08 (s, 6H)。

1.3.9 (3-甲基苯基)二甲基硅烷 (2s-1) 无色油状, 产率87%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.12 (t, J = 6 Hz, 1H), 6.92～6.84 (m, 3H), 4.01 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.12 (s, 2H), 0.07 (s, 6H)。

1.4 硅硼酸酯2a～2s合成方法

取联硼酸频哪醇酯/双联(2,4-二甲基-2,4-戊二醇)硼酸酯 (2.5 equiv.) 与5%铂碳催化剂 (0.03 equiv.) 共同混合于2.5 mL环己烷溶剂中, 随后加入取代苄基二甲基硅烷衍生物 (1.0 equiv.)。反应体系在80 ℃条件下持续反应24 h, 期间采用TLC监测反应进度。反应终止后, 将混合液冷却至25 ℃, 通过硅藻土垫层过滤去催化剂。收集的滤液经减压蒸馏浓缩, 所得粗产物使用硅胶柱色谱进行纯化 (洗脱剂配比: 石油醚/乙酸乙酯 = 80∶1～100∶1)。

1.4.1 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基苄基硅烷 (2a)[36] 无色油状, 产率37%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.26～7.14 (m, 2H), 7.08～7.04 (m, 2H), 2.17 (s, 2H), 1.30～1.20 (m, 12H), 0.17 (s, 6H)。

1.4.2 (4,4,6,6-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环己-2-基)二甲基苄基硅烷 (2b) 无色油状, 产率26%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.17～7.15 (m, 2H), 7.10～6.89 (m, 3H), 2.11 (s, 2H), 1.79 (s, 2H), 1.28 (s, 12H), −0.04 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 144.23, 130.79, 130.60, 126.26, 72.53, 51.36, 33.85, 27.37, −2.17; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{16}H_{27}BO_2Si$ $[M+H]^+$ 290.187 3, found 290.187 1。

1.4.3 二甲基(3-苯基丙基)(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)硅烷 (2c) 无色油状, 产率35%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.25～7.21 (m, 5H), 3.33 (s, 2H), 2.57 (s, 2H), 1.17 (s, 12H), 0.55 (s, 2H), −0.01 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 143.23, 129.05, 128.79, 126.20, 117.87, 82.54, 39.55, 37.57, 24.50, 24.48, 17.16, −1.06; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{17}H_{29}BO_2Si$ $[M+H]^+$, 304.203 0, found 304.203 0。

1.4.4 二甲基(1-苯乙基)(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)硅烷(2d) 无色油状, 产率41%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.24～7.19 (m, 2H), 7.10～7.03 (m, 3H), 2.34～2.28 (m, 1H), 1.42～1.40 (m, 3H), 1.22 (s, 12H), −0.01 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 146.29, 127.94, 127.07, 124.18, 83.19, 77.34, 77.02, 76.70, 28.24, 37.03, 24.98, 15.56, −5.17, −5.73; HRMS (ESI) m/z Calcd. for $C_{16}H_{27}BO_2Si$ $[M+H]^+$, 290.187 3, found 290.187 1。

1.4.5 2-((二甲基(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)硅基)甲基)苯甲腈 (2e) 白色固体, 产率28%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.53～7.13 (m,

4H), 2.48 (s, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.10 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 145.95, 132.62, 132.21, 129.14, 124.43, 118.95, 111.23, 83.50, 37.01, 24.10, −4.01; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{24}BNO_2SiNa$ $[M+Na]^+$ 324.156 7, found 324.157 1。

1.4.6 3-((二甲基 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)硅基)甲基)苯甲腈 (2f) 白色固体, 产率31%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.48～7.21 (m, 4H), 2.20 (s, 2H), 1.21 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 143.80, 133.78, 132.62, 129.88, 128.84, 120.44, 113.14, 84.67, 26.15, 26.11, −3.10; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{25}BNO_2Si$ $[M+H]^+$ 302.174 8, found 302.175 0。

1.4.7 4-((二甲基 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)硅基)甲基)苯甲腈 (2g) 白色固体, 产率43%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.48～7.45 (m, 2H), 7.16～7.14 (m, 2H), 2.26 (s, 2H), 1.21 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 150.40, 134.58, 131.52, 121.91, 109.79, 86.10, 28.14, 27.02, −2.39; HRMS (ESI): Calcd. for $C_{16}H_{24}BNO_2Si$ $[M+H]^+$: 302.174 8, found 302.175 5。

1.4.8 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(2-氟苄基)硅烷 (2h) 橙色油状, 产率53%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.99～6.97 (m, 4H), 2.24 (s, 2H), 1.37 (s, 12H), 0.16 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 161.06, 159.46, 130.84, 126.09 (d, J_{C-F} = 7.5 Hz), 124.07 (d, J_{C-F} = 16.5 Hz), 114.92, 82.12, 23.91, 19.36, −1.88; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{24}BFO_2Si$ $[M+H]^+$ 294.162 3, found 294.162 4。

1.4.9 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(3-氟苄基)硅烷 (2i) 橙色油状, 产率52%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.13～6.77 (m, 3H), 2.18 (s, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 163.65, 143.64, 129.32, 129.26 (d, J_{C-F} = 9 Hz), 123.79, 114.92, 114.79, 110.70 (d, J_{C-F} = 19.5 Hz), 83.38, 24.98, 24.59, −4.19; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{24}BFO_2Si$ $[M+H]^+$ 294.162 3, found 294.162 3。

1.4.10 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(4-氟苄基)硅烷 (2j) 橙色油状, 产率52%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.99～6.93 (m, 4H), 2.15 (s, 2H), 1.38 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 161.00, 159.41, 136.22, 129.22 (d, J_{C-F} = 7.5 Hz), 114.61 (d, J_{C-F} = 21 Hz), 83.30, 24.96, 24.58, 24.55, 23.79, −4.26; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{24}BFO_2Si$ $[M+H]^+$ 294.162 3, found 294.162 2。

1.4.11 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(4-(三氟甲氧基)苄基)硅烷 (2k) 无色油状, 产率33%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.10～7.04 (m, 4H), 2.17 (s, 2H), 1.20 (s, 12H), 0.06 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 146.00, 139.79, 129.09, 120.72, 83.34, 24.92, 24.54, 24.26, −4.20; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{24}BF_3O_3Si$ $[M+H]^+$ 360.154 0, found 360.153 9。

1.4.12 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(4-叔丁基苄基)硅烷 (2l) 白色固体, 产率53%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.19～6.97 (m, 4H), 2.13 (s, 2H), 1.28 (s, 9H), 1.20 (s, 12H), 0.06 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 146.44, 137.49, 127.80, 124.90, 83.19, 34.15, 31.44, 24.97, 24.60, 24.00, −4.05; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{19}H_{33}BO_2Si$ $[M+H]^+$ 332.234 3, found 332.234 6。

1.4.13 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(2-三氟甲基苄基)硅烷 (2m) 无色油状, 产率43%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.54～7.14 (m, 4H), 2.40 (s, 2H), 1.24 (s, 12H), 0.04 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 140.47, 131.16, 130.70, 125.92, 125.89, 125.85, 125.81 (q, J_{C-F} = 12 Hz), 123.84, 83.31, 77.21, 77.00, 76.78, 25.01, 24.94, 21.38, −3.72; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{24}BF_3O_2Si$ $[M+H]^+$ 344.159 1, found 344.159 2。

1.4.14 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(3-三氟甲基苄基)硅烷 (2n) 无色油状, 产率42%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.42～7.10 (m, 4H), 2.24 (s, 2H), 1.20 (s, 12H), 0.06 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 141.93, 131.41, 130.53, 130.41, 130.20, 130.06 (q, J_{C-F} = 21 Hz), 128.31, 124.66, 124.64, 120.71, 120.69, 83.40, 37.02, 24.90, 24.53, −4.24; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{24}BF_3O_2Si$ $[M+H]^+$ 344.159 1, found 344.158 8。

1.4.15 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(3,5-双(三氟甲基)苄基)硅烷 (2o) 无色油状, 产率33%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: *7.56*～7.52 (m, 3H), 2.31 (s, 2H), 1.20 (s, 12H), 0.07 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 147.28, 133.58, 133.37, 133.15 (q, J_{C-F} = 66 Hz), 132.93, 131.02, 127.37, 137.57, 124.29, 123.76, 120.34, 86.12, 27.37, 26.92, 26.58, −2.48; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{17}H_{23}BF_6O_2Si$ $[M+H]^+$ 412.146 5, found 412.146 5。

1.4.16 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(2-氯苄基)硅烷 (2p) 橙色油状, 产率43%。

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.26～7.25 (m, 1H), 7.16～6.94 (m, 3H), 2.36 (s, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.08 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 139.82, 133.34, 130.67, 129.90, 126.97, 137.89, 83.97, 37.66, 37.28, 22.72, −3.08; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{24}BClO_2Si$ $[M+H]^+$ 310.132 7, found 310.133 6。

1.4.17 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(3-氯苄基)硅烷 (2q), 橙色油状, 产率42%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.13～6.89 (m, 4H), 2.15 (s, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 143.10, 133.78, 129.19, 128.05, 126.30, 123.98, 83.40, 24.99, 24.58, 24.55, −4.20; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{15}H_{24}BClO_2Si$ $[M+H]^+$ 310.132 7, found 310.133 6。

1.4.18 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(2-甲基苄基)硅烷 (2r) 无色油状, 产率31%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.04～6.98 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.19 (s, 2H), 1.21 (s, 12H), 0.06 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 139.30, 134.63, 129.95, 128.78, 137.54, 123.98, 83.24, 24.97, 21.33, 20.42, −3.61; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{27}BO_2Si$ $[M+H]^+$ 290.187 3, found 290.187 7。

1.4.19 (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊-2-基)二甲基(3-甲基苄基)硅烷 (2s) 无色油状, 产率28%。^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.08～6.87 (m, 4H), 2.28 (s, 3H), 2.14 (s, 2H), 1.22 (s, 12H), 0.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 138.76, 137.67, 129.06, 128.12, 137.38, 124.94, 117.29, 82.08, 26.56, 24.42, 23.96, 20.52, −1.93; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{16}H_{27}BO_2Si$ $[M+H]^+$ 290.187 3, found 290.187 7。

1.5 前药3的合成

将他莫昔芬 (200 mg, 0.538 mmol, 1 equiv.) 溶于DCM (5 mL) 中, 于0 ℃下缓慢加入*m*CPBA [139.34 mg (含量85%), 0.807 mmol, 1.5 equiv.], 于该温度下搅拌2 h, 待反应结束后, 浓缩反应液, 采用硅胶柱层析 (二氯甲烷∶甲醇 = 10∶1) 分离纯化得油状化合物, 产率90%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.35 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.18～7.16 (m, 2H), 7.13～7.10 (m, 3H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.41～4.38 (m, 2H), 3.82～3.76 (m, 2H), 3.37 (s, 6H), 2.45 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.92 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 167.26, 155.39, 143.68, 142.36, 142.01, 138.00, 136.85, 132.23, 129.78, 129.56, 128.29, 128.06, 126.76, 126.29, 113.45, 69.55, 61.71, 58.92, 29.17, 13.67; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{29}NO_2$ $[M+H]^+$ 388.227 1, found 388.227 2。

2 二级反应动力学常数测定方法

本文采用假一级动力学常方法来测定硅硼酸酯与氮氧化物的反应动力学常数。具体来说, 首先, 取4 mL PBS缓冲液 (pH = 7.4) 与3.99 mL乙腈混合, 加入10 μL化合物**1b**乙腈溶液 (3.2 mmol·L^{-1}), 使**1b**最终浓度为4 μmol·L^{-1}。设置4个平行实验组, 各组分别加入不同体积的**2a**～**2s**系列化合物的乙腈母液 (4 mmol·L^{-1}), 保持乙腈与PBS的体积比为1∶1, 使**2a**～**2s**的终浓度分别为80、100、120和140 μmol·L^{-1}。将**1b**的溶液与各化合物 (**2a**～**2s**) 溶液等体积混合以启动反应, 使用港东F-320型荧光分光光度计在25 ℃条件下, 于450 nm处实时记录荧光强度变化。所得动力学数据经Prism软件处理, 通过拟合荧光强度−时间曲线获得假一级反应动力学速率常数k_1。进一步对k_1与**2a**～**2s**浓度进行线性回归分析, 所得斜率即为二级反应速率常数k_2。

3 细胞毒实验

将小鼠乳腺癌细胞 (4T1) 采用含10%热灭活胎牛血清 (FBS) 和1%双抗 (青霉素−链霉素) 的RPMI1640完全培养基, 于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中常规培养。实验前24 h, 将处于对数生长期的细胞用无血清培养基以每孔10 000个细胞的密度接种于96孔培养板中。将待测硅硼酸酯化合物**2a**溶于DMSO配制成母液, 随后用无血清RPMI1640培养基梯度稀释, 确保各实验组DMSO终浓度不超过1%。设置2、4、6、8和10 μmol·L^{-1}共5个给药浓度梯度, 药物处理持续24 h后, 移除含药培养基, 用PBS洗涤细胞3次。每孔加入100 μL含10% CCK-8试剂的培养基, 继续培养1～4 h。最后使用多功能酶标仪在450 nm处测定吸光度 (optical density, OD) 值, 所得数据经软件分析处理, 根据下面公式计算出不同浓度下的细胞存活率。

细胞存活率 (%) = ($OD_{实验组}$ − $OD_{空白对照组}$)/($OD_{细胞对照组}$ − $OD_{空白对照组}$) × 100%

4 细胞成像实验

实验前24 h, 将A549细胞以适宜密度接种于6孔培养板中。分别将化合物**1b**和**2b**溶解于DMSO中配制储备液, 随后使用完全培养基进行稀释。实验设置3个处理组: 溶剂对照组、**1b**单药组 (10 μmol·L^{-1})、**1b** (10 μmol·L^{-1}) 与**2b** (80 μmol·L^{-1}) 联合处理组。各组细胞在37 ℃、5% CO_2条件下孵育3 h后, 弃去含药培养基, 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗培养孔3次, 每孔加入1 mL新鲜RPMI 1640培养基。最后, 采用蔡司LMS 710型激光共聚焦显微镜进行荧光图像采集。

作者贡献: 季兴跃、闵庆强提出研究思路, 设计研究方案; 焦国峰、张静芬负责进行实验; 季兴跃、闵庆强分析数据; 焦国峰、张静芬负责论文起草; 季兴跃负责最终修订版本。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Ji XY, Pan ZX, Yu BC, et al. Click and release: Bioorthogonal approaches to "on-demand" activation of prodrugs [J]. Chem Soc Rev, 2019, 48: 1077-1094.

[2] Wang J, Wang X, Fan XY, et al. Unleashing the power of bond cleavage chemistry in living systems [J]. ACS Cent Sci, 2021, 7: 929-943.

[3] Kondengadan SM, Bansal S, Yang C, et al. Click chemistry and drug delivery: A bird's-eye view [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 1990-2016.

[4] Li J, Chen PR. Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12: 129-137.

[5] Dong R, Yang XX, Wang BH, et al. Mutual leveraging of proximity effects and click chemistry in chemical biology [J]. Med Res Rev, 2023, 43: 319-342.

[6] Zhu YC, Lin F, Liu ZQ, et al. Bioorthogonal cleavage chemistry: Harnessing the bond-break reactions for biomolecule manipulations in living systems [J]. Chin J Chem, 2025, 43: 553-566.

[7] Shang YK, Ju CY, Xie DP, et al. Preparation and characterization of tumor-targeting doxorubicin liposomesmodified *via* click chemistry [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2016, 47: 708-713.

[8] Versteegen RM, Ten Hoeve W, Rossin R, et al. Click-to-release from *trans*-cyclooctenes: Mechanistic insights and expansion of scope from established carbamate to remarkable ether cleavage [J]. Angew Chem Int Ed, 2018, 57: 10494-10499.

[9] Matikonda SS, Orsi DL, Staudacher V, et al. Bioorthogonal prodrug activation driven by a strain-promoted 1,3-dipolar cycloaddition [J]. Chem Sci, 2015, 6: 1212-1218.

[10] Steiger AK, Yang Y, Royzen M, et al. Bio-orthogonal "click-and-release" donation of caged carbonyl sulfide (COS) and hydrogen sulfide (H_2S) [J]. Chem Commun, 2017, 53: 1378-1380.

[11] Tu JL, Xu MH, Parvez S, et al. Bioorthogonal removal of 3-isocyanopropyl groups enables the controlled release of fluorophores and drugs *in vivo* [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140: 8410-8414.

[12] Porte K, Renoux B, Péraudeau E, et al. Controlled release of a micelle payload *via* sequential enzymatic and bioorthogonal reactions in living systems [J]. Angew Chem Int Ed, 2019, 58: 6366-6370.

[13] Neumann K, Gambardella A, Lilienkampf A, et al. Tetrazine-mediated bioorthogonal prodrug-prodrug activation [J]. Chem Sci, 2018, 9: 7198-7203.

[14] Jiménez-Moreno E, Guo ZJ, Oliveira BL, et al. Vinyl ether/tetrazine pair for the traceless release of alcohols in cells [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56: 243-247.

[15] Wang QY, Wang YP, Ding JJ, et al. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis [J]. Nature, 2020, 579: 421-426.

[16] Zheng YQ, Ji XY, Yu BC, et al. Enrichment-triggered prodrug activation demonstrated through mitochondria-targeted delivery of doxorubicin and carbon monoxide [J]. Nat Chem, 2018, 10: 787-794.

[17] Ji XY, Zhou C, Ji KL, et al. Click and release: A chemical strategy toward developing gasotransmitter prodrugs by using an intramolecular Diels-Alder reaction [J]. Angew Chem Int Ed, 2016, 55: 15846-15851.

[18] Chen YH, Zhao RH, Tang C, et al. Design and development of a bioorthogonal, visualizable and mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H_2S) delivery system [J]. Angew Chem Int Ed, 2022, 61: e202112734.

[19] Li YS, Lou ZB, Li HY, et al. Bioorthogonal ligation and cleavage by reactions of chloroquinoxalines with ortho-dithiophenols [J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59: 3671-3677.

[20] Rossin R, Versteegen RM, Wu J, et al. Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice [J]. Nat Commun, 2018, 9: 1484.

[21] Fan XY, Ge Y, Lin F, et al. Optimized tetrazine derivatives for rapid bioorthogonal decaging in living cells [J]. Angew Chem Int Ed, 2016, 55: 14046-14050.

[22] van Onzen AHAM, Versteegen RM, Hoeben FJM, et al. Bioorthogonal tetrazine carbamate cleavage by highly reactive *trans*-cyclooctene [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142: 10955-10963.

[23] He XY, Li J, Liang XX, et al. An all-in-one tetrazine reagent for cysteine-selective labeling and bioorthogonal activable prodrug construction [J]. Nat Commun, 2024, 15: 2831.

[24] Su DY, Li J, Pan LL, et al. Design and synthesis of tetrazine bioorthogonal fluorogenic probes [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 1086-1095.

[25] Yu XY, Li J, Li Y, et al. Bioorthogonal click-to-release reaction for regulating iodo-BODIPY PDT probe [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 3400-3407.

[26] Wang XM, Li J, Shen GH, et al. Tetrazine bioorthogonal click-to-release reaction for releasing peptides [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 1634-1646.

[27] Wang Q, Song YK, Yuan SW, et al. Prodrug activation by 4, 4'-bipyridine-mediated aromatic nitro reduction [J]. Nat Commun, 2024, 15: 8643.

[28] Xu WY, Tang C, Zhao RH, et al. Sydnthiones are versatile bioorthogonal hydrogen sulfide donors [J]. Nat Commun, 2024, 15: 10288.

[29] Srinivasan S, Yee NA, Zakharian M, et al. SQ3370, the first clinical click chemistry-activated cancer therapeutic, shows

safety in humans and translatability across species [J]. bioRxiv, 2023. DOI: 10.1101/2023.03.28.534654.

[30] Bui N, Kwatra V, Ryan CW, et al. Phase 2a results of SQ3370, a doxorubicin-based click chemistry therapeutic in patients with advanced STS: Planned interim analysis [J]. J Clin Oncol, 2024, 42: 11555.

[31] Min QQ, Ji XY. Bioorthogonal bond cleavage chemistry for on-demand prodrug activation: Opportunities and challenges [J]. J Med Chem, 2023, 66: 16546-16567.

[32] Wilkovitsch M, Kuba W, Keppel P, et al. Transforming aryl-tetrazines into bioorthogonal scissors for systematic cleavage of *trans*-cyclooctenes [J]. Angew Chem Int Ed, 2025, 64: e202411707.

[33] Rahm M, Keppel P, Šlachtová V, et al. Sulfonated hydroxyaryl-tetrazines with increased p*Ka* for accelerated bioorthogonal click-to-release reactions in cells [J]. Angew Chem Int Ed, 2025, 64: e202411713.

[34] Carlson JCT, Mikula H, Weissleder R. Unraveling tetrazine-triggered bioorthogonal elimination enables chemical tools for ultrafast release and universal cleavage [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140: 3603-3612.

[35] Versteegen RM, Rossin R, Filot IAW, et al. Ortho-functionalized pyridinyl-tetrazines break the inverse correlation between click reactivity and cleavage yields in click-to-release chemistry [J]. Commun Chem, 2024, 7: 302.

[36] Yan ZC, Pan YY, Jiao GF, et al. A bioorthogonal decaging chemistry of *N*-Oxide and silylborane for prodrug activation both *in vitro* and *in vivo* [J]. J Am Chem Soc, 2023, 145: 24698-24706.

[37] Liu M, Wang YH, Yan ZC, et al. Photoclick and release: Co-activation of carbon monoxide and a fluorescent self-reporter, COS or sulfonamide with fast kinetics [J]. ChemBioChem, 2023, 24: e202200506.

[38] Zhou Z, Feng S, Zhou JJ, et al. On-demand activation of a bioorthogonal prodrug of SN-38 with fast reaction kinetics and high releasing efficiency *in vivo* [J]. J Med Chem, 2022, 65: 333-342.

[39] Ji XY, Aghoghovbia RE, De La Cruz LKC, et al. Click and release: A high-content bioorthogonal prodrug with multiple outputs [J]. Org Lett, 2019, 21: 3649-3652.