



生物正交化学在活体标记及药物传递中的研究进展*

韩雨彤^{1,3)**} 潘 宏^{2)**} 罗英梅^{1,2)**} 马爱青^{1,2)} 邢婕华^{1,2)}陈 泽²⁾ 郑明彬^{1,2,4)***} 李宝红^{1)***} 蔡林涛^{2,4)***}⁽¹⁾ 广东医科大学药学院, 东莞 523808; ⁽²⁾ 中国科学院深圳先进技术研究院, 中国科学院健康信息学重点实验室,广东省纳米医药重点实验室, 深圳518055; ⁽³⁾ 深圳市罗湖区人民医院药学部, 深圳 518001;⁽⁴⁾ 珠海先进技术研究院有限公司, 珠海 519000)

摘要 生物正交化学反应是一类可以在生理条件下发生的化学反应, 具有简单、高效、高特异性的特点, 在生物医学的研究中被广泛应用. 基于生物体天然生命过程的代谢工程, 可对生物分子进行无损、高效的生物代谢修饰, 是一种理想的生物修饰技术. 通过生物代谢途径可有效地将各种化学报告基团引入靶标物的生物分子中, 有利于携带配对基团的标记物与其发生生物正交反应, 从而在活体系统中实现生物分子的标记示踪和药物递送. 这种基于代谢工程与生物正交化学的标记策略因为具有两者之间的优势, 在生物医学工程中的标记、成像示踪、诊断等领域展现出巨大的研究价值与应用潜力. 本文介绍了生物正交和代谢工程的原理与生物医学研究进展, 阐述了生物正交化学在分子成像和药物传递等方面的研究与应用.

关键词 生物正交化学, 代谢工程, 生物标记, 活体示踪, 药物传递**中图分类号** R9, O62**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0291

生物正交化学(bioorthogonal chemistry)反应是指在不干扰机体正常生物过程的情况下, 可以在生物体内进行的化学反应. 这种化学反应即使在复杂的生理条件下也具有优良的选择性, 反应过程简单快速并且不会受体内其他成分的影响, 不会产生毒副作用, 在生物医学的研究中有着广泛的应用前景^[1-2]. 该反应通过生物、化学反应将目的报告基团修饰到靶标物上, 随后与携带配对基团的标记物发生化学连接反应, 从而实现标记物对靶标物的稳定偶联^[3-4]. 目前广泛使用的生物正交反应包括: 金属催化或光催化的生物正交反应以及无需催化的生物正交反应. 铜催化的叠氮和末端炔基之间的环加成反应(copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC)是生命科学研究中常用的生物正交反应, 但是铜离子对生物体具有毒性, 不适宜广泛应用. 在此基础上, Bertozzi等^[5]于2004年开发了一种新型的无铜生物正交化学反应(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC), 该反应避免了铜作为催化剂所产生的细

胞毒性, 成功地将生物正交反应应用于活细胞(图1). 常用的生物正交化学基团主要包括叠氮(N_3)基团、二苯并环辛基(dibenzocyclooctyne, DBCO)、双环[6.1.0]壬炔(bicyclo[6.1.0]nonyne, BCN)和双苯并八元环炔(dibenzocyclooctyne, DIBO)等. 其中, N_3 基团与炔基(DBCO, BCN)之间具有高度的反应活性. N_3 基团尺寸小, 引入到

* 国家自然科学基金(21701033, 81971749, 81601552), 深圳市科技计划(自由探索)(JCY20170818163739458, JCY20170306160217433), 广东省自然科学基金(2019A1515011524), 广东医科大学校级学科带头人培育基金(4SG19003Gh), “高校教育人才”组团式帮扶专项基金(4SG19057G, 4SG19045G), 广东医科大学博士启动基金(B2017016)和珠海市创新创业团队项目(ZH01110405180056PWC)资助.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0755-86392210

蔡林涛. E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

李宝红. E-mail: gdmcli@126.com

郑明彬. E-mail: mb.zheng@siat.ac.cn

收稿日期: 2019-11-28, 接受日期: 2020-01-22

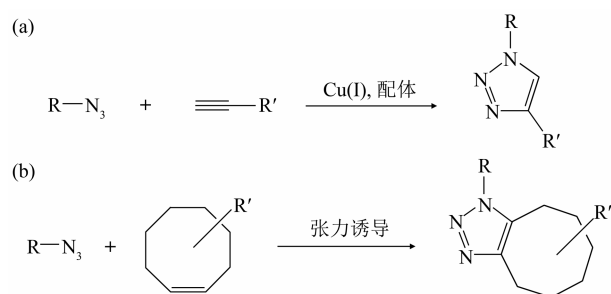


Fig. 1 Reaction schemes of the bioorthogonal chemistries [5]

图1 常用的生物正交反应示意图 [5]

(a) 铜催化的生物正交反应 (CuAAC). (b) 无铜生物正交反应 (SPAAC).

活体系统中仅产生微小的结构扰动, 不影响生物分子的功能, 并且天然生物体内不存在 N_3 分子, 因而不会与体内的生物分子反应, 是一种理想的生物正交功能基团 [6-7].

为了在体内实现高效、特异的生物正交标记, 首先需要将理想的正交反应基团 (如叠氮基团) 选择性地引入到细胞或生物体的目标生物分子上, 随

后利用配对基团修饰的标记物对目标生物分子进行选择连接. 因此, 如何安全、无损地将生物正交基团引入生物靶标物中仍然是一个亟待解决的问题. 近年来, 代谢工程 (metabolic engineering) 作为一种无损、高效的活体修饰技术, 可利用生物体固有的代谢合成途径将功能基团引入到活体系统中 [8-11]. 这是由于生物体在代谢过程中需要利用氨基酸、糖类或脂类等生物成分, 通过将功能基团修饰到糖类或脂类等生物分子中, 便可通过固有的生物合成途径在体外或体内直接将功能基团修饰到活细胞或活体生物中. 基于代谢工程与生物正交化学的标记技术, 通过在活细胞或整个生物体中引入特定的生物正交化学基团, 随后与配对基团修饰的探针或纳米药物通过生物正交化学反应连接, 可以实现对目标分子或生物体的特定标记、细胞或病原微生物的成像示踪、药物的靶向递送等 (图2) [6]. 该技术通过细胞内源性代谢过程而快速形成稳定的共价连接, 而且不受外源化学反应干扰, 因此具有无损、高效、稳定、特异的优点, 并成为研究者关注的焦点. 本文主要从以下几个方面阐述生物正交化学在活体系统中应用的最新研究进展.

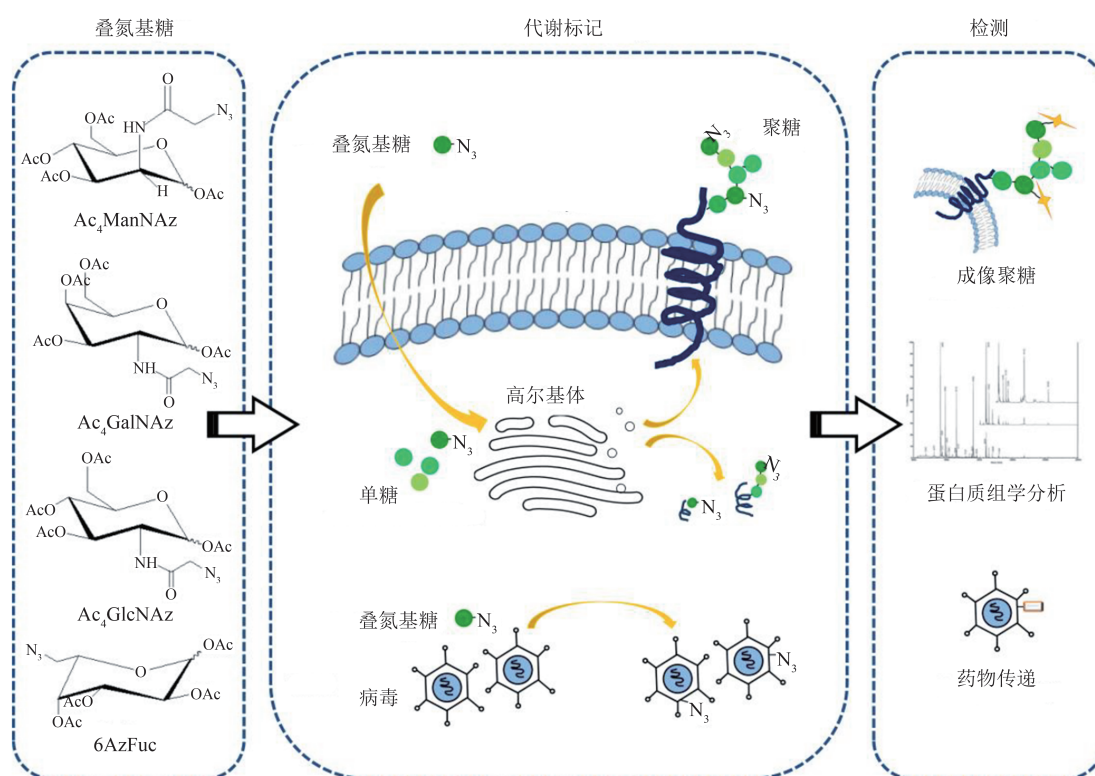


Fig. 2 The application of metabolic engineering strategy in labeling and targeted drug delivery [6]

图2 细胞糖代谢工程在标记示踪与靶向药物递送方面的应用 [6]

1 生物正交化学在活体标记与示踪中的应用

为了了解细胞或病原微生物等活体系统的生物学机制, 对目标生物分子在体内进行特定的标记和追踪是重要的研究手段. 目前常用较为成熟的生物标记技术, 包括荧光蛋白基因编码和荧光染料抗体偶联. 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因编码标记常用于蛋白质的功能研究, 分析活细胞和整个机体中的蛋白质表达和定位, 但是此类较大的基因编码标记物会对蛋白质的结构产生扰动, 从而影响相关蛋白质的表达或功能, 而且这种基因标记方法不适用于细胞中的聚糖、脂类、核酸等生物分子^[1, 7, 12]. 另外, 虽然荧光染料抗体偶联物也已广泛应用于跟踪活细胞和整个机体的生物分子, 适用于多种生物分子的成像, 但是这些偶联试剂的大尺寸和物理性质阻碍了它们在活体系统中结合抗原, 从而限制了其在生物体内的应用^[1, 6]. 因此, 寻找一个能在活体内广泛适用且对生物体几乎没有影响的标记技术, 对于活体生物的功能研究具有极其重要意义. 近年来, 科学家们发展了基于代谢工程的生物正交化学修饰策略, 该策略利用生物自身的生物合成和代谢机制, 将独特的功能基团 (生物正交化学功能基团) 整合到目标生物分子中, 从而实现在复杂的生物体内对目标分子的标记和研究.

1.1 细胞的生物正交代谢标记

在活细胞中, 蛋白质、糖类和脂质都可以被生物正交基团修饰^[7, 13]. 通过化学合成的方法将生物正交基团连接到代谢类似物上, 利用生物体的代谢合成过程将生物正交基团引入细胞, 随后用配对基团修饰的反应探针连接, 可以实现对目标生物分子的标记或成像, 进而分析细胞或目标生物分子的定位和重要功能.

科学家研究证实了代谢标记的生物正交基团能有效标记细胞, Bertozzi 的团队^[14]利用糖代谢工程与生物正交反应, 分析了活斑马鱼的胚胎发育过程中多种糖类结构. 该团队在斑马鱼胚胎发育过程中, 在不同的细胞发展阶段加入环辛炔功能化的唾液酸, 使其作为一种糖类衍生物可以被细胞利用并将功能基团引入细胞表面的糖蛋白上, 随后与配对基团修饰的荧光探针通过生物正交反应连接, 可视化地研究斑马鱼胚胎发育过程中糖类表达的动力学和定位. Rong 等^[15]使用 N_3 修饰的糖类似物在体内

代谢标记大鼠的心脏聚糖, N_3 可与 DBCO 修饰的荧光探针反应, 在活体心脏中可视化监控心肌细胞表面糖蛋白. 此外, 将心脏分离裂解后, 与炔炔修饰的生物素反应, 用链霉亲和素珠富集后, 进行了蛋白质组学的鉴定. 这一研究在大鼠中实现了心脏聚糖的体内代谢标记和成像, 有利于探索心脏糖基在病理生理过程中的生物合成和功能应用. Lee 等^[16]开发了一种简单可控的干细胞成像方法, 首先利用叠氮化的代谢前体 $Ac_4ManNAz$, 通过糖代谢在干细胞表面引入 N_3 基团作为外源性化学受体, 随后制备携带 BCN 基团的纳米颗粒 BCN-CNPs, 将 Cy5.5 荧光染料、氧化铁纳米粒子和金纳米粒子分别偶联或包封在 BCN-CNPs 上, 用于光学、磁共振和计算机断层扫描成像. 这些可成像的纳米粒子通过生物正交反应结合在干细胞表面上的化学受体, 实现对干细胞的体内追踪.

1.2 病原微生物的生物正交标记与示踪

细菌和病毒等病原微生物严重威胁着人类的生命健康, 探索病原微生物在活体内的侵袭行为和机制显得尤为重要. 利用代谢工程和生物正交反应, 可以实现对病原微生物的活体示踪, 有利于研究其致病机制. 细菌多糖具有独特的结构, 多与发病机制有关, 是广泛研究的靶点. 通过代谢工程和生物正交化学对细菌多糖进行标记, 能够可视化地研究细菌的体内侵袭行为^[17]. Swarts 等^[18]设计了一系列含有 N_3 基团的海藻糖类似物, 分枝杆菌通过代谢合成途径利用人工合成的海藻糖合成自身的细胞壁糖脂, 从而在细菌表面引入 N_3 基团. 随后与炔基功能化的荧光探针通过生物正交反应连接, 用于后续糖脂分布、转运和动力学成像以及代谢产物的分析和发现. Geva-Zatorsky 等^[19]利用糖代谢工程和生物正交化学对肠道的各种共生厌氧菌进行标记, 可视化地研究了厌氧微生物在小鼠体内的分布和定位, 以及微生物与宿主的相互作用.

病毒感染导致的疾病是对人类健康的一大威胁, 了解病毒入侵的机制有助于我们更好地预防和治疗病毒感染导致的疾病^[20-21]. 通常使用基因工程技术使病毒表达荧光受体或者使用荧光试剂化学偶联病毒, 以实现对病毒的成像和跟踪^[20, 22]. 然而, 这些标记技术容易影响病毒的侵袭能力, 无法准确再现病毒在机体内的感染过程, 不利于病毒入侵机制的研究. 由于病毒的蛋白质和核酸等分子均可被标记, 将代谢工程与生物正交化学结合, 可实现对病毒的无损代谢修饰, 最终实现对病毒的实时跟踪

或标记^[23-24]。

病毒外部结构的组成部分,如病毒衣壳、囊膜等,是由糖类、蛋白质和脂质构成的,这些成分主要来源于宿主细胞。通过细胞的代谢过程,可在病毒进行复制与组装时将携带功能基团的代谢衍生物嵌入到病毒的衣壳、囊膜等结构中。Pan等^[25]提出的利用生物正交和脂类代谢标记技术追踪病毒的策略,减少了化学标记对病毒的干扰,有效研究了病毒的体内感染过程。通过将叠氮化物修饰的脂类代谢标记到H5N1p病毒包膜上,利用DBCO修饰的近红外荧光探针通过生物正交反应偶联小鼠肺部的病毒,实现了体内的病毒成像和追踪。

2 生物正交化学在靶向传递中的应用

通过代谢工程,生物正交化学基团可以被修饰到细胞或病原微生物的表面,以此构建人工靶点。将其应用于药物的靶向传递时,能显著提高药物的生物利用率,从而降低药物的毒副作用。在纳米材料的发展过程中,生物配体例如抗体、多肽、适配体等通常被连接到纳米材料表面用于增加与特定细胞系的结合,从而实现药物的靶向递送^[26-28]。然而,这种传统的靶向修饰策略会增加纳米颗粒制备的复杂性,给生物应用带来潜在的风险^[29-30]。近年来,基于代谢工程的生物正交化学标记作为一种有效的靶向修饰策略,被广泛应用于药物的靶向设计。

2.1 抗肿瘤药物的靶向递送

传统的靶向配体修饰策略已经被证明具有较好的肿瘤靶向效果,例如抗体偶联药物。然而,基于抗体的药物传递系统存在一定的局限性,包括肿瘤的异质性以及由于长期化疗或长期药物暴露导致的癌细胞中抗原的下调,严重影响了抗肿瘤药物的靶向应用^[8, 13]。代谢工程可以在包括肿瘤细胞在内的各种细胞表面,人工引入生物正交功能基团(如 N_3 基团)作为化学受体,并且不受限于细胞的表型,这些人工化学受体可大量表达,用于生物正交标记、靶向识别和药物递送^[8, 31-32]。

目前,生物正交化学反应已被应用于成像剂和抗肿瘤药物的组织靶向递送,具有很好的体内示踪和肿瘤靶向效果^[33-34]。在癌症治疗中,体内可视化的成像剂递送以及针对肿瘤组织的特异性药物的递送是非常有必要的。可视化有利于体内的肿瘤诊断,而高效特异的药物传递可以提高药物的治疗效果,减少不良反应。基于糖代谢的生物正交化学使

得生物体内靶向的药物传递以及肿瘤的诊断治疗获得进一步的改善。Lee等^[31]通过两步体内肿瘤靶向策略实现了对肿瘤的高效特异性靶向。第一步通过小鼠尾静脉注射包载了叠氮化糖 $Ac_4ManNAz$ 的纳米颗粒,通过高渗透长滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)使其在肿瘤部位累积,并且通过细胞固有的生物代谢作用在肿瘤细胞引入 N_3 基团。第二步尾静脉注射包载了Ce6的BCN修饰的纳米颗粒,通过体内生物正交反应使含药纳米颗粒靶向富集在肿瘤部位,显著提高了对肿瘤的治疗效果。Du等^[35]首先给小鼠尾静脉注射装载了叠氮化糖衍生物的纳米胶束($Ac_4ManNAz-LP$),使其依靠EPR效应累积在肿瘤部位并对肿瘤代谢修饰 N_3 基团,随后将制备的DBCO修饰的光敏剂纳米颗粒(DBCO-ZnPc-LP)注射到小鼠体内,结果证明DBCO-ZnPc-LP通过生物正交反应能很好的累积在肿瘤部位,产生高效的光热/光声协同抗肿瘤效果。此外,我们课题组构建了一种双靶向的仿生纳米颗粒^[36],将 N_3 基团引入到T细胞表面作为人工靶点,提取细胞膜包裹于纳米颗粒表面,利用T细胞膜的免疫识别功能以及 N_3 基团与BCN基团之间的生物正交反应,实现了对肿瘤的高效靶向和光热治疗(图3)。

2.2 免疫治疗中的靶向应用

免疫治疗是肿瘤治疗的有效方法之一,生物正交化学反应可用于免疫刺激物的传递,增强免疫治疗抗肿瘤的效果。Zhang等^[37]通过在磁性纳米簇的表面包裹被 N_3 工程化的白细胞膜,然后通过生物正交反应在细胞膜表面修饰T细胞刺激物,设计了一种人工抗原呈递细胞(aAPCs)。制备的aAPCs可以刺激抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)的扩增,并且通过磁共振成像和磁控技术,可以直观有效地引导CTL进入肿瘤组织,增强T细胞的抗肿瘤治疗效果。Mongis等^[38]将不同的免疫刺激物与DBCO基团进行偶联,用叠氮化的糖预处理肿瘤细胞使其表达 N_3 基团,随后通过生物正交化学反应将免疫刺激物连接到肿瘤细胞表面,成功引入的免疫刺激物可以激活小鼠的抗肿瘤免疫作用,显著抑制肿瘤的生长。

此外,生物正交化学在免疫治疗中也发挥着很大的作用,具有很好的应用前景。我们课题组基于生物正交糖代谢构建了一类新型的非天然单糖类似物($Ac_4ManN-BCN$),并将其应用于T细胞的免疫治疗研究。该单糖类似物高效地将化学报告基团

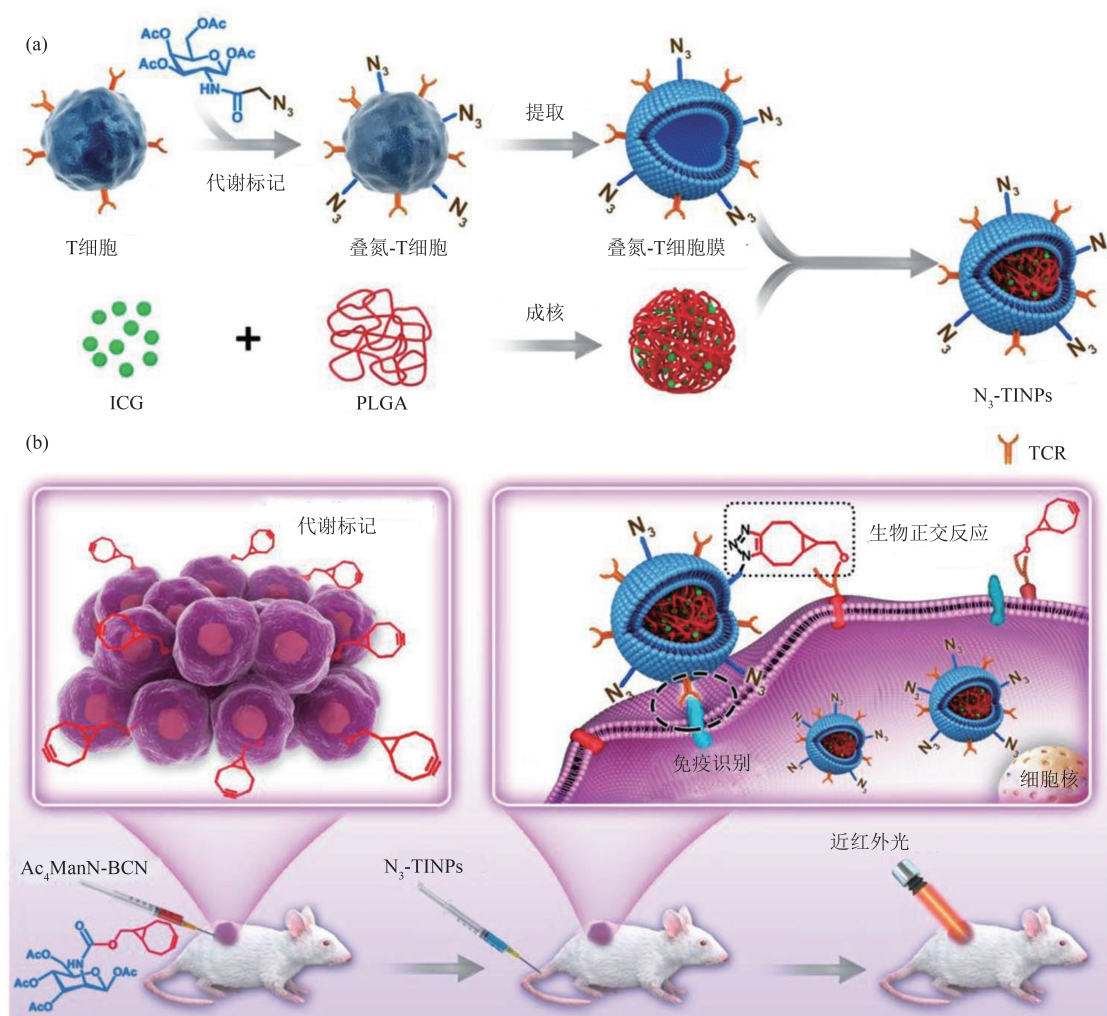


Fig. 3 Schematic illustration of tumor targeted drug delivery based on the metabolic glycoengineering and bioorthogonal chemistry^[36]

图3 细胞糖代谢生物正交标记用于抗肿瘤药物的靶向递送^[36]

(a) 叠氮修饰的T细胞膜仿生纳米颗粒的制备; (b) 肿瘤的糖代谢标记与T细胞膜纳米药物的肿瘤光热靶向治疗。

BCN标记于肿瘤细胞表面, 形成一种肿瘤表面的人工靶点, 构建一种人工T细胞-肿瘤靶向策略. 叠氮修饰后的T细胞(N₃-T细胞)利用生物正交反应快速地靶向BCN标记的肿瘤细胞(BCN-tumor细胞), 并促进T细胞的快速激活及其对肿瘤的识别杀伤作用^[39]. 同时, 我们利用前期细胞糖代谢工程将化学报告基团(-N₃)嵌入T细胞膜中, 构建人源T细胞人工受体, 病毒经纳米材料(PEI-DBCO)包裹后, 病毒粒子表面的DBCO基团与T细胞人工受体(-N₃)发生高效、特异的生物正交反应, 促进病毒与T细胞的相互作用与基因转导, 从而构建出安全、高效的CAR-T细胞, 实现对肿瘤的免疫治疗^[40](图4).

2.3 抗菌药物的靶向递送

细菌感染引发许多疾病, 不同抗生素可以选择性地杀死不同种类的细菌从而起到治疗疾病的效果. 但是抗生素的滥用会导致细菌产生耐药性, 而耐药细菌感染的治疗是一个棘手的问题, 因此迫切需要寻求替代的方法特异且非侵入性地检测、靶向和杀死细菌, 以避免抗生素耐药性. 代谢标记技术能够将化学功能基团修饰到细菌等病原体的表面, 基于代谢工程的生物正交化学可作为改善抗菌效果的有效措施. Mao等^[41]利用代谢标记和生物正交化学实现了对细菌的体内检测和治疗. 该团队制备的装载了叠氮化物d-AzAla的有机框架材料(d-AzAla@MIL-100(Fe) NPs)可以累积在小鼠

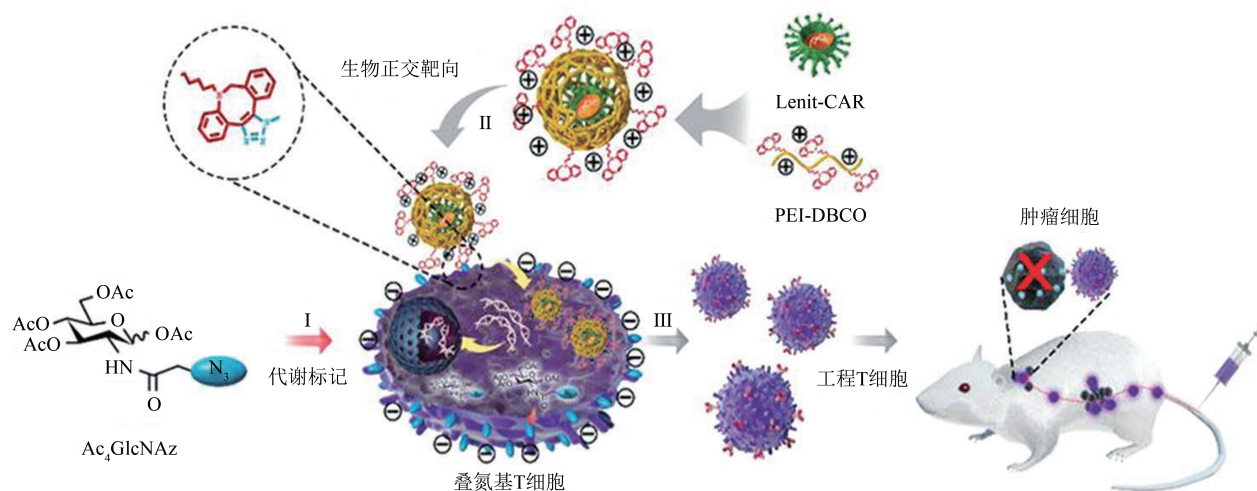


Fig.4 Application of bioorthogonal chemistry in CAR-T cells manufacture and immunotherapy^[40]

图4 生物正交化学在CAR-T细胞生产和免疫治疗中的应用^[40]

感染部位，并在H₂O₂炎症环境中迅速降解，释放出的d-AzAla被细菌利用后，细菌的细胞壁引入了N₃基团，随后通过给小鼠注射DBCO标记的AIE纳米颗粒，可在感染组织中对细菌进行特异性追踪和有效清除（图5）。Kaewsapsak等^[42]设计了一种针对幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）的免疫

治疗方法，通过糖代谢标记将N₃基团选择性的标记到Hp表面，随后将与免疫刺激物结合的探针通过生物正交反应选择性靶向连接到Hp，免疫刺激物会触发宿主的免疫系统并杀死被标记的细菌，从而达到对Hp感染的有效治疗。

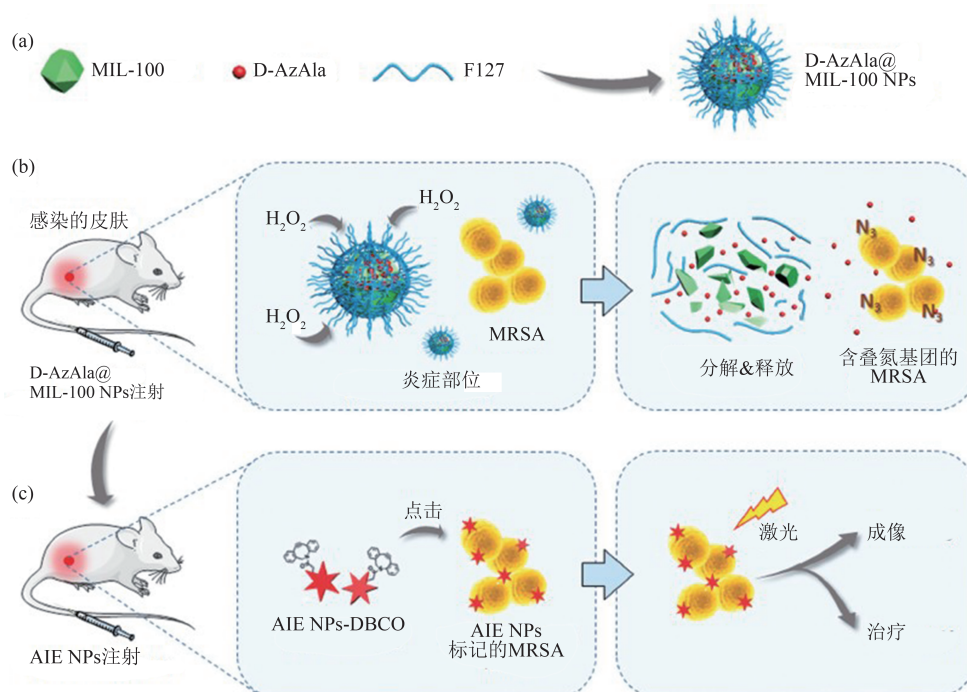


Fig. 5 Schematic illustration of bacteria diagnosis and therapy by metabolically labeled bioorthogonal groups^[41]

图5 生物正交代谢标记用于细菌的诊断和治疗^[41]

(a) d-AzAla@MIL-100 (Fe) NPs 纳米颗粒的制备；(b) 炎症响应介导的细菌叠氮代谢标记；(c) DBCO-AIE荧光探针小鼠体内细菌的捕获与清除。

3 结 语

基于代谢工程的生物正交化学标记技术具有无损、高效、特异等特点, 已经逐渐成为一种理想的体内外的生物标记和靶向修饰的策略. 代谢工程可以利用生物体固有的代谢合成, 将功能基团修饰到细胞或病原体表面, 是细胞和病原体功能修饰的一种强大的工具. 利用生物正交化学, 可以在体内研究生物功能和机制, 包括标记示踪细胞的生物分子、研究细菌或病毒入侵机制和实现药物靶向递送等. 目前的研究已经证明, 基于代谢工程的生物正交化学标记技术在生物标记成像和药物靶向递送中具有广阔的应用前景. 但是生物正交化学的发展仍然面临着很多挑战, 例如寻找速度更快、选择性更高的反应, 并将其应用于生物功能的研究中, 这些仍需我们进一步的探究. 随着生物正交化学的不断发展, 开发新的反应基团, 优化生物正交化学反应的动力学和稳定性, 将为生物正交化学带来新的发展机遇.

参 考 文 献

- [1] Prescher J A, Bertozzi C R. Chemistry in living systems. *Nat Chem Biol*, 2005, **1**(1):13-21
- [2] Best M D. Click chemistry and bioorthogonal reactions: Unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*, 2009, **48**(28):6571-6584
- [3] Rahim M K, Kota R, Lee S, *et al.* Bioorthogonal chemistries for nanomaterial conjugation and targeting. *Nanotechnol Rev*, 2013, **2**(2):215-227
- [4] Meghani N M, Amin H H, Lee B J. Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discov Today*, 2017, **22**(11):1604-1619
- [5] Agard N J, Prescher J A, Bertozzi C R. A strain-promoted [3 + 2] azide - alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(46):15046-15047
- [6] Zhang X, Zhang Y. Applications of azide-based bioorthogonal click chemistry in glycobiology. *Molecules*, 2013, **18**(6): 7145-7159
- [7] Borrmann A, van Hest J C M. Bioorthogonal chemistry in living organisms. *Chem Sci*, 2014, **5**(6):2123-2134
- [8] Yoon H Y, Koo H, Kim K, *et al.* Molecular imaging based on metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. *Biomaterials*, 2017, **132**:28-36
- [9] Laughlin S T, Bertozzi C R. Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via staudinger ligation. *Nat Protoc*, 2007, **2**(11):2930-2944
- [10] Wang H, Wang R, Cai K, *et al.* Selective *in vivo* metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting. *Nat Chem Biol*, 2017, **13**(4): 415-424
- [11] Wang H, Tang L, Liu Y, *et al.* *In vivo* targeting of metabolically labeled cancers with ultra-small silica nanoconjugates. *Theranostics*, 2016, **6**(9):1467-1476
- [12] Hao Z, Hong S, Chen X, *et al.* Introducing bioorthogonal functionalities into proteins in living cells. *Acc Chem Res*, 2011, **44**(9):742-751
- [13] Takayama Y, Kusamori K, Nishikawa M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. *Molecules*, 2019, **24**(1): 172-191
- [14] Agarwal P, Beahm B J, Shieh P, *et al.* Systemic fluorescence imaging of zebrafish glycans with bioorthogonal chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(39):11504-11510
- [15] Rong J, Han J, Dong L, *et al.* Glycan imaging in intact rat hearts and glycoproteomic analysis reveal the upregulation of sialylation during cardiac hypertrophy. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(50): 17468-17476
- [16] Lee S, Yoon H I, Na J H, *et al.* *In vivo* stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface. *Biomaterials*, 2017, **139**:12-29
- [17] Tra V N, Dube D H. Glycans in pathogenic bacteria - potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents. *Chem Commun*, 2014, **50**(36):4659-4673
- [18] Swarts B M, Holsclaw C M, Jewett J C, *et al.* Probing the mycobacterial trehalome with bioorthogonal chemistry. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(39):16123-16126
- [19] Geva-Zatorsky N, Alvarez D, Hudak J E, *et al.* *In vivo* imaging and tracking of host-microbiota interactions via metabolic labeling of gut anaerobic bacteria. *Nat Med*, 2015, **21**(9):1091-1100
- [20] Huang L L, Xie H Y. Progress on the labeling and single-particle tracking technologies of viruses. *Analyst*, 2014, **139**(13): 3336-3346
- [21] Zheng L L, Yang X X, Liu Y, *et al.* In situ labelling chemistry of respiratory syncytial viruses by employing the biotinylated host-cell membrane protein for tracking the early stage of virus entry. *Chem Commun*, 2014, **50**(99):15776-15779
- [22] Ilyushina N A, Chernyy E S, Korchagina E Y, *et al.* Labeling of influenza viruses with synthetic fluorescent and biotin-labeled lipids. *Virology*, 2014, **29**(4):199-210
- [23] Müller T, Sakin V, Müller B. A spotlight on viruses—application of click chemistry to visualize virus-cell interactions. *Molecules*, 2019, **24**(3):481-510
- [24] Ouyang T, Liu X, Ouyang H, *et al.* Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. *Virus Res*, 2018, **256**:21-28
- [25] Pan H, Li W J, Yao X J, *et al.* In situ bioorthogonal metabolic labeling for fluorescence imaging of virus infection *in vivo*. *Small*, 2017, **13**(17-24):1604036
- [26] Byrne J D, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**(15):1615-1626

- [27] de Melo-Diogo D, Pais-Silva C, Dias D R, *et al.* Strategies to improve cancer photothermal therapy mediated by nanomaterials. *Adv Healthc Mater*, 2017, **6**(10):1700073-1700092
- [28] Bazak R, Hourri M, El Achy S, *et al.* Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, **141**(5):769-784
- [29] Saei A A, Yazdani M, Lohse S E, *et al.* Nanoparticle surface functionality dictates cellular and systemic toxicity. *Chem Mater*, 2017, **29**(16):6578-6595
- [30] Pelaz B, Charron G, Pfeiffer C, *et al.* Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small*, 2013, **9**(9-10):1573-1584
- [31] Lee S, Koo H, Na J H, *et al.* Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry. *ACS Nano*, 2014, **8**(3):2048-2063
- [32] Lee S, Jung S, Koo H, *et al.* Nano-sized metabolic precursors for heterogeneous tumor-targeting strategy using bioorthogonal click chemistry *in vivo*. *Biomaterials*, 2017, **148**:1-15
- [33] Layek B, Sadhukha T, Prabha S. Glycoengineered mesenchymal stem cells as an enabling platform for two-step targeting of solid tumors. *Biomaterials*, 2016, **88**:97-109
- [34] Koo H, Lee S, Na J H, *et al.* Bioorthogonal copper-free click chemistry *in vivo* for tumor-targeted delivery of nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2012, **51**(47):11836-11840
- [35] Du L, Qin H, Ma T, *et al.* *In vivo* imaging-guided photothermal/ photoacoustic synergistic therapy with bioorthogonal metabolic glycoengineering-activated tumor targeting nanoparticles. *ACS Nano*, 2017, **11**(9):8930-8943
- [36] Han Y, Pan H, Li W, *et al.* T cell membrane mimicking nanoparticles with bioorthogonal targeting and immune recognition for enhanced photothermal therapy. *Adv Sci*, 2019, **6**(15):1900251
- [37] Zhang Q, Wei W, Wang P, *et al.* Biomimetic magnetosomes as versatile artificial antigen-presenting cells to potentiate t-cell-based anticancer therapy. *ACS Nano*, 2017, **11**(11):10724-10732
- [38] Mongis A, Piller F, Piller V. Coupling of immunostimulants to live cells through metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. *Bioconjug Chem*, 2017, **28**(4):1151-1165
- [39] Li W, Pan H, He H, *et al.* Bio-orthogonal t cell targeting strategy for robustly enhancing cytotoxicity against tumor cells. *Small*, 2018, **15**(4):1804383-1804388
- [40] Pan H, Li P, Li G, *et al.* Glycometabolic bioorthogonal chemistry-guided viral transduction for robust human t cell engineering. *Adv Funct Mater*, 2019, **29**(22):1807528
- [41] Mao D, Hu F, Kenry, *et al.* Metal-organic-framework-assisted *in vivo* bacterial metabolic labeling and precise antibacterial therapy. *Adv Mater*, 2018, **30**(18):1706831
- [42] Kaewsapsak P, Esonu O, Dube D H. Recruiting the host's immune system to target helicobacter pylori's surface glycans. *Chembiochem*, 2013, **14**(6):721-726

Advances in Bioorthogonal Chemistry for *in vivo* Labeling and Drug Delivery*

HAN Yu-Tong^{1,3)**}, PAN Hong^{2)**}, LUO Ying-Mei^{1,2)**}, MA Ai-Qing^{1,2)}, XING Jie-Hua^{1,2)},
CHEN Ze²⁾, ZHENG Ming-Bin^{1,2,4)***}, LI Bao-Hong^{1)***}, CAI Lin-Tao^{2,4)***}

⁽¹⁾School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

⁽²⁾CAS Key of Laboratory of Health Informatics, Guangdong Key Laboratory of Nanomedicine, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

⁽³⁾Department of Pharmacy, Shenzhen Luohu People's Hospital, Shenzhen 518001, China;

⁽⁴⁾Zhuhai Institute of Advanced Technology Chinese Academy of Sciences, Zhuhai 519000, China)

Abstract Bioorthogonal chemistry reaction is a kind of chemical reaction that can occur under physiological conditions, which has been widely used in biomedical research field owing to its high efficiency, specificity and simplicity. Metabolic engineering based on metabolic biosynthesis pathway is a reliable modification technique, achieving the non-destructive and efficient labeling of living molecules. The various chemical reporter groups could be effectively introduced into target biomolecules *via* biological metabolic process, which allowing the targets were labeled with complementary probes through bioorthogonal reaction for molecular labeling and drug delivery in living systems. Combined the advantages of metabolic engineering and bioorthogonal chemistry, this labeling strategy has great application potential and research value in labeling, trace imaging and diagnosis in the fields of biomedical engineering. Herein we introduced the theory and research progress of bioorthogonal chemistry and metabolic engineering in biomedical fields, and also specially analyzed the application of bioorthogonal chemistry in molecular imaging and drug delivery.

Key words bioorthogonal chemistry, metabolic engineering, molecular labeling, *in vivo* tracking, drug delivery

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0291

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21701033, 81971749, and 81601552), Shenzhen Science and Technology Program (JCY20170818163739458, JCY20170306160217433), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019A1515011524), School-Level Academic Leader of Guangdong Medical University (4SG19003Gh), "Group-type" Special Supporting Project for Educational Talents in University (4SG19057G, 4SG19045G), PhD Foundation of Guangdong Medical University (B2017016) and Zhuhai Innovation and Entrepreneurship Team Project (ZH01110405180056PWC).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-755-86392210

CAI Lin-Tao. E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

LI Bao-Hong. E-mail: gdmcli@126.com

ZHENG Ming-Bin. E-mail: mb.zheng@siat.ac.cn

Received: November 28, 2019 Accepted: January 22, 2020