

基于半胱氨酸的蛋白质化学修饰研究进展

王长流^a 赵永丽^a 赵军锋^{*,b}^(a) 江西师范大学化学化工学院 国家单糖化学合成工程技术研究中心 南昌 330022)^(b) 广州医科大学药学院 呼吸疾病国家重点实验室 广州 511436)

摘要 蛋白质是生物体内含量最丰富的生物大分子, 参与了几乎所有生命活动的进程. 蛋白质的化学修饰是研究与调控其理化性质和生物功能的有效方式, 当前大部分蛋白质的化学修饰是基于氨基酸残基侧链上活泼官能团的反应性来实现. 在 20 种天然氨基酸中, 半胱氨酸由于其巯基具有独特的亲核性、较低的氧化还原电势以及较低的自然丰度等特点, 成为了科学家研究蛋白质化学修饰的首选. 总结了近些年具有代表性的基于半胱氨酸的蛋白质化学修饰的研究进展, 阐述了相关研究的难点, 并对其未来发展方向进行了展望.

关键词 多肽修饰; 蛋白质化学修饰; 半胱氨酸

Recent Advances in Chemical Protein Modification via Cysteine

Wang, Changliu^a Zhao, Yongli^a Zhao, Junfeng^{*,b}^(a) National Research Center for Carbohydrate Synthesis, College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022)^(b) State Key Laboratory of Respiratory Disease, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436)

Abstract Proteins are the most abundant biomolecules in nature and are involved almost in all living processes. Chemical modification of proteins is an efficient strategy to mediate and study the physical and chemical properties and biological functionalities of proteins. Most protein chemical modifications are based on the bioorthogonal reactivities of the side chain functional groups of certain amino acid residues. Among 20 proteinogenic amino acids, cysteine has become the best choice for chemical protein modification, owing to its relative low abundance in proteins, the unique nucleophilicity and low redox potential of its mercaptan group. The recent advances in chemical protein modification via cysteine are comprehensively reviewed and the challenges and applications for future development are discussed.

Keywords peptide modification; chemical protein modification; cysteine

蛋白质作为生物大分子在生物体内发挥着重要的作用, 是生命活动的主要承担者. 氨基酸的种类和序列是形成蛋白质三维结构的基石, 而翻译后修饰则赋予了蛋白质不同的生物功能. 蛋白质的翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)^[1]是在蛋白质翻译后经历的一个共价加工的过程, 主要是指在一个或者多个氨基酸残基上引入修饰基团, 从而赋予蛋白质不同的理化性质与生物功能. 目前对蛋白质翻译后修饰的研究已经比较深入, 在已经发现的 300 多种类型中^[1], 主要的形式包括蛋白质的糖基化^[2]、磷酸化^[3]、乙酰化^[4]以及泛素化^[5]等. 随着研究的深入, 科学家们希望利用化学方法

选择性地特定位点来修饰蛋白质, 从而对蛋白质进行标记、示踪和改造等^[6]. 例如, 抗体偶联药物(antibody-drug conjugates, ADCs)是通过共价结合的方式将抗体与细胞毒性药物连接起来的一类药物, 这种化学修饰的方法将单克隆抗体药物的高特异性和小分子细胞毒性药物高活性的优点相结合, 可以提高药物的靶向性, 降低药物的毒副作用^[7]. 聚乙二醇化(PEGylation)是通过化学方法在蛋白质上连接具有亲水性的聚乙二醇, 蛋白质药物在聚乙二醇化后可以有效减少与蛋白酶的接触, 提高药物的稳定性, 延长半衰期^[8]. 通过化学反应对蛋白质进行荧光标记, 可以使用荧光显微镜观察蛋白质的变

* Corresponding author. E-mail: zhaojf@jxnu.edu.cn

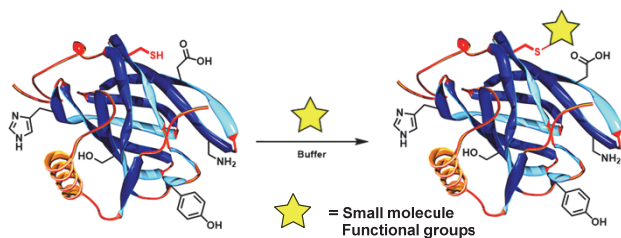
Received March 2, 2022; revised May 7, 2022; published online May 31, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21778025, 91853114).

国家自然科学基金(Nos. 21778025, 91853114)资助项目.

化,更好地研究蛋白质在细胞体内的活动^[9]. 这些通过化学修饰在蛋白质上引入各种类型的功能性基团的方法已经广泛地应用于生物和医药领域. 国内外科学家近年来对多肽和蛋白质等生物大分子的生物正交反应进行了深入的研究^[10]. 相较于普通的有机化学反应,蛋白质由于其较大的分子量和复杂的微环境,生物正交反应往往要在较低的反应浓度中进行,这就需要反应活性足够高并且可以定点选择性地修饰某个位点.

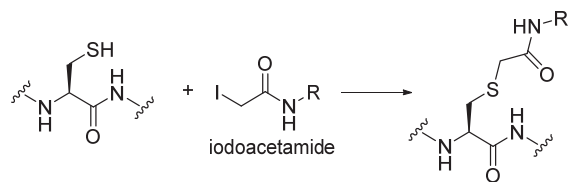
自然界存在的蛋白质是由 20 种天然氨基酸构成的(近年来,研究者发现硒代半胱氨酸 Sec 是由密码子 TGA 翻译形成的,被称作第 21 种天然氨基酸^[11]),其中一些氨基酸的侧链含有活泼官能团,如丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)的羟基、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)的羧基、赖氨酸(Lys)的氨基、半胱氨酸(Cys)的巯基、精氨酸(Arg)的胍基、酪氨酸(Tyr)的酚羟基以及组氨酸(His)的咪唑基等. 大部分蛋白质的化学修饰都是基于这些活泼官能团的特殊反应来进行的. 在这些氨基酸侧链活泼官能团中, Cys 上的巯基由于其具有较低的 S—H 键解离能以及硫原子较大的可极化性^[12], 非常活泼, 具有独特的亲核性. 另一方面, Cys 在蛋白质中的自然丰度很低(<2%)^[13], 使得它有利于发生特异性的修饰. 因此化学工作者对 Cys 的化学修饰的研究最为广泛(Scheme 1)^[14]. 本文总结了近年来多肽和蛋白质半胱氨酸修饰的研究进展,并对每种方法的优缺点进行了分析.



图式 1 基于半胱氨酸的蛋白质化学修饰
Scheme 1 Chemical protein modification via cysteine

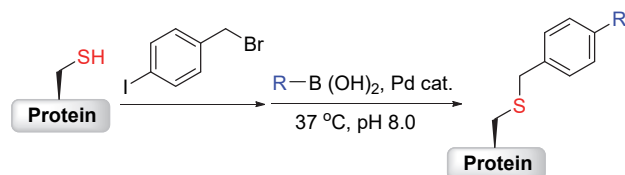
1 与卤代试剂等亲电试剂反应

巯基与卤代试剂的反应是最早的巯基修饰方法之一^[14a]. 早在 1935 年,就有科学家使用碘代乙酰胺(iodoacetamide)和 Cys 上的巯基进行反应(Scheme 2),并将之用于蛋白质 Cys 修饰来研究角蛋白的性质^[15]. 由于碘代乙酰胺会和 Lys 或者 His 的侧链官能团产生副反应,作者使用活性较低的氯代乙酰胺(chloroacetamide)来避免此类现象的发生^[16]. 近年来,越来越多利用卤代试剂修饰多肽和蛋白质上 Cys 的新方法被开发了出来^[17].



图式 2 碘代乙酰胺对蛋白半胱氨酸的修饰
Scheme 2 Protein modification using iodoacetamide

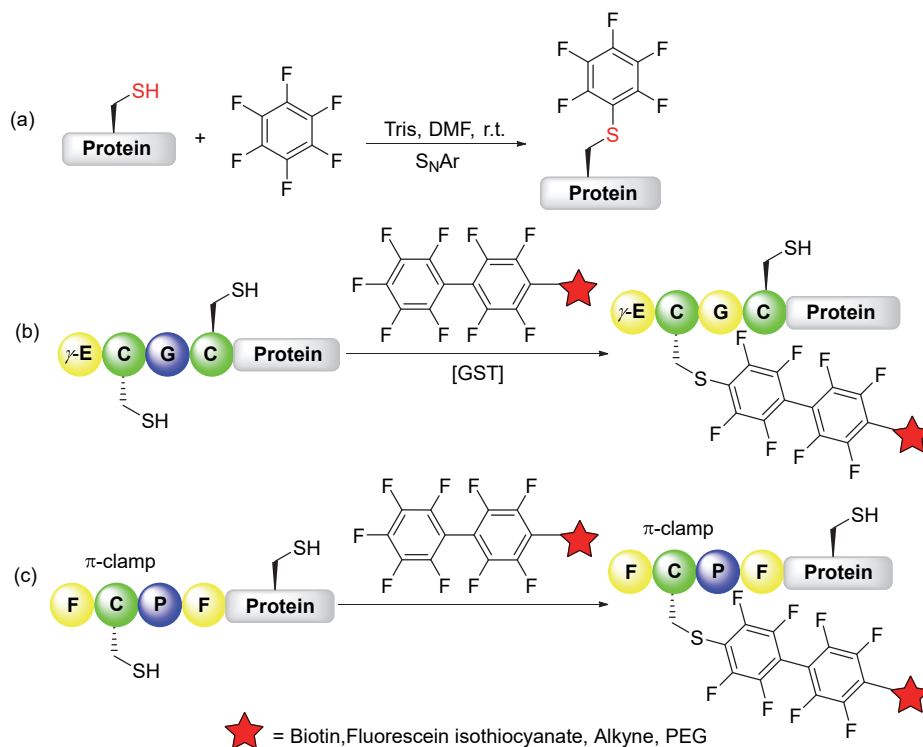
2009 年, Chalker 课题组^[18]利用 1-溴甲基-4-碘苯作为巯基修饰试剂,通过硫醚键的形成把碘苯官能团引入到蛋白质上,在温和的条件下发生 Suzuki-Miyaura 偶联反应(Scheme 3),实现了对蛋白质的二次修饰,这项工作成功地将传统的过渡金属催化的反应应用到了多肽和蛋白质修饰上,拓展了蛋白质化学修饰方法库.



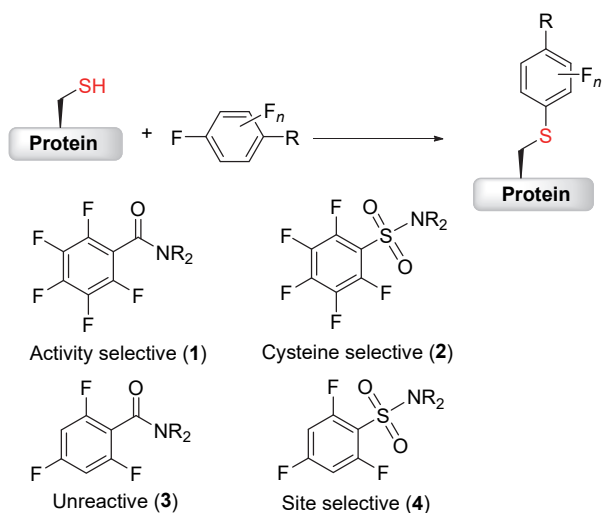
图式 3 水溶液中蛋白质上的 Suzuki-Miyaura 偶联反应
Scheme 3 Protein Suzuki-Miyaura cross-coupling in aqueous media

2013 年, Pentelute 课题组^[19]利用芳香族亲核取代反应(S_NAr),发展了一种六氟苯对蛋白 Cys 的芳基化修饰方法(Scheme 4, a). 由于六氟苯在该体系中的溶解性和反应活性较低,他们进一步开发了全氟联苯,发现在谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase, GST)的催化下,全氟联苯可选择性地与含谷胱甘肽序列(γ-E-C-G)上的 Cys 反应,而其它位置的 Cys 不受影响,反应时间也缩短到 2 h 以内(Scheme 4, b)^[20]. 2015 年,他们^[21]又发现被称作“π-clamp”的苯丙氨酸-半胱氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸(F-C-P-F)序列上的 Cys 可以选择性地和全氟联苯反应,其它序列上未反应的 Cys 又可以和其它巯基修饰试剂反应(Scheme 4, c). 他们利用这种“π-clamp”的特性,在抗体上选择性地连接药物分子,合成出抗体偶联药物,从而实现了选择性地杀死 HER2-positive 乳腺癌细胞.

2018 年, Meldal 和 Diness 课题组^[22]通过对芳基氟试剂的活性进行合理化调整,实现了对多肽和蛋白质 Cys 的选择性修饰(Scheme 5). 芳基试剂 1 只在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中有比较好的反应活性,而在对烟草蚀纹病毒(TEV, 表面含有一个 Cys129, 催化位点含有另一个 Cys170)进行修饰时发现,芳基试剂 2 对这两个 Cys 都进行了修饰,芳基试剂 4 则可以对 Cys170 进行选择

图式 4 全氟芳香族分子与蛋白质半胱氨酸残基之间的 S_NAr 反应Scheme 4 S_NAr reactions between perfluoroaromatic molecules and cysteine residues in proteins

修饰, 而芳基试剂 **3** 则活性较低, 对这两个位点上的 Cys 都没有修饰. 这种选择性的化学修饰可以应用于细胞裂解液中蛋白质的荧光标记、半胱氨酸蛋白酶的选择性抑制以及活性蛋白分析.



图式 5 氟苯类试剂对蛋白质半胱氨酸的选择性修饰

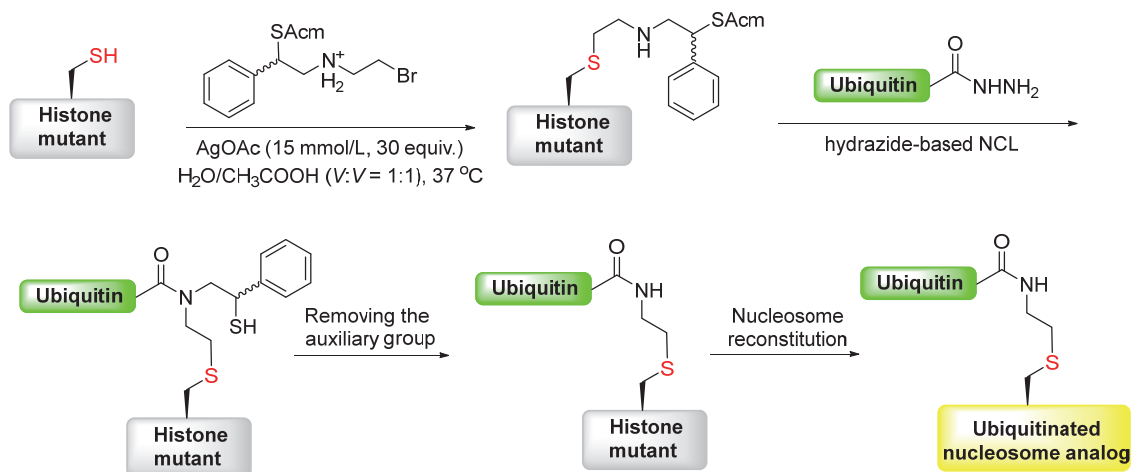
Scheme 5 Fluorobenzene reagents for cysteine-selective protein modification

组蛋白的泛素化影响着核小体的结构与功能^[23]. 高效制备泛素化组蛋白及其类似物对于组蛋白泛素化的理化性质研究具有重要意义. 2019 年, 刘磊、田长麟和李宜明团队^[24]利用 Cys 的化学修饰手段发展了一种

Cys 氨乙基化辅助的组蛋白泛素化的反应(cysteine-aminoethylation assisted chemical ubiquitination, CAACU). 该方法的关键是使用 *N*-烷基化的 2-溴乙胺完成 Cys 的氨乙基化, 接着与连有泛素的酰肼反应得到泛素化的组蛋白(Scheme 6). 最后通过核小体的重组得到泛素化的核小体类似物. 这种方法能够从表达约 1.5~6 mg/L 的重组蛋白中快速生产修饰化的组蛋白. 通常蛋白质的泛素化是发生在 Lys 侧链上的, 而这种利用 Cys 化学修饰得到的含硫醚键 Lys 衍生物的泛素化产物也可以被去泛素酶(DUBs)识别和水解. 对含 H2BK₆₃₄Ub 核小体的冷冻电子显微镜(cryoelectron microscopy, cryo-EM)显示, 获得的 CAACU 组蛋白具有良好的结构研究价值. 总的来说, 这项工作验证了 CAACU 策略在生物化学和生物物理研究中简单有效地合成泛素化修饰的组蛋白的效用.

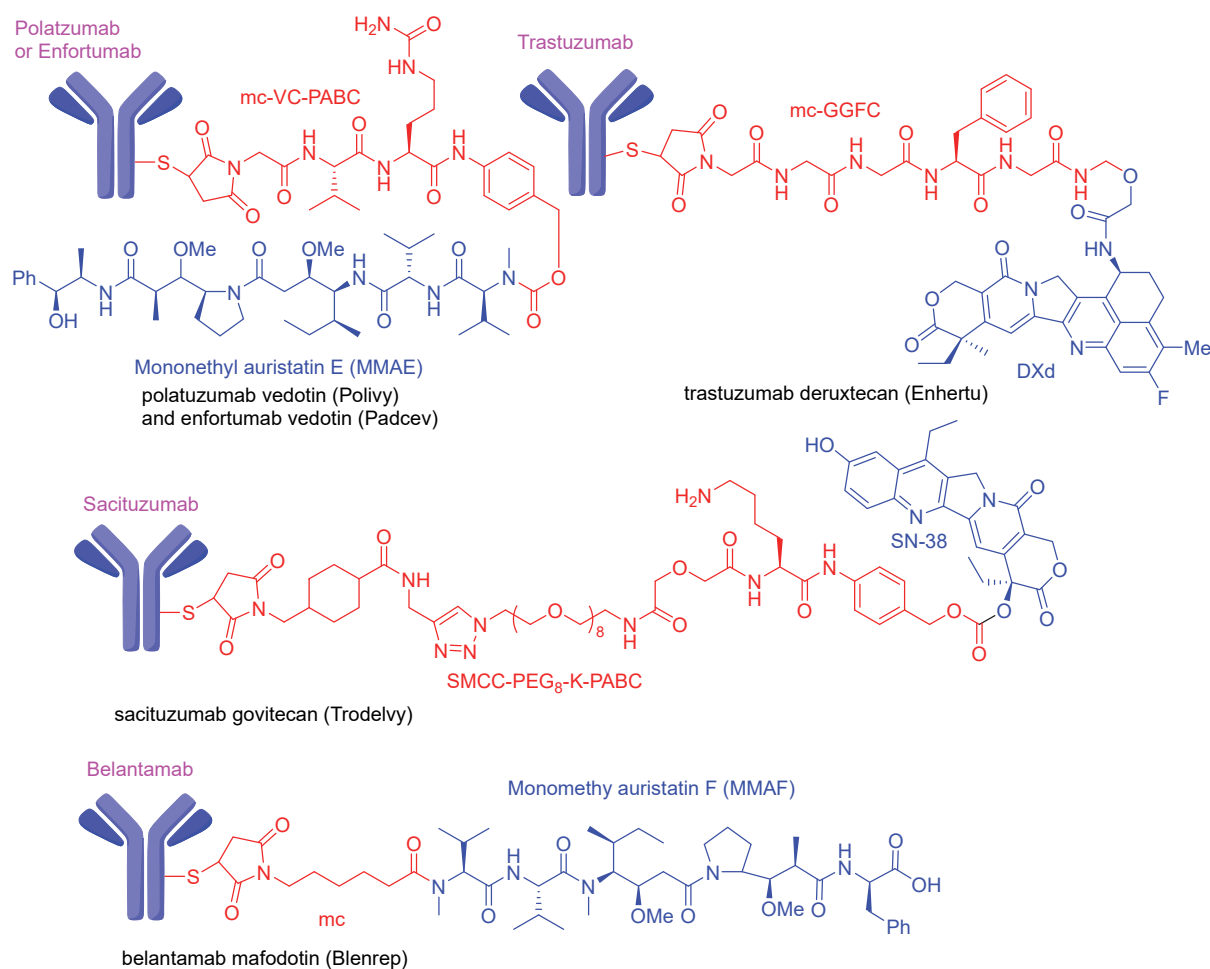
2 与马来酰亚胺反应

马来酰亚胺是目前最常用的 Cys 修饰试剂. 近年来, ADCs^[25]的研发一直是肿瘤精准治疗的热门领域之一. ADCs 是由抗体(antibody)、连接器(linker)和细胞毒素分子(payload)三部分构成. 目前美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的 9 款 ADCs 中, 有 5 款药物是用马来酰亚胺作为连接子的(Scheme 7)^[26]. 马来酰亚胺之所以成为 ADCs 连接子的首选, 是因为它独特的反应活性



图式 6 半胱氨酸氨乙基化辅助的蛋白质泛素化

Scheme 6 Cysteine-aminoethylation assisted chemical ubiquitination



图式 7 临床获批上市的马来酰亚胺作为连接子的抗体偶联药物

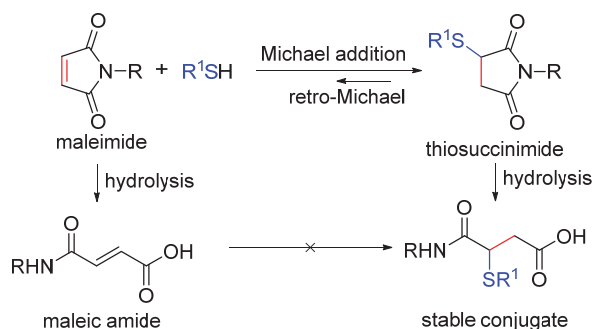
Scheme 7 Clinically-approved ADCs with maleimide as the linker

以及反应选择性^[27]。

不过, 马来酰亚胺和巯基的迈克尔加成反应也存在一定的缺陷, 其产物琥珀酰亚胺的稳定性较差, 会发生逆迈克尔加成(retro-Michael)反应, 使得马来酰亚胺从

巯基上脱除, 导致药物在还没有到达靶标位置时被释放出来, 产生严重的毒副作用。研究发现琥珀酰亚胺中的一个 C—N 键其实也可发生断裂导致开环, 但这个键的断裂并不会破坏对蛋白质的化学修饰, C—N 键断裂后,

C—S 键的稳定性反而会大大提高, 因此加速琥珀酰亚胺水解生成稳定的产物有利于该方法的应用(Scheme 8). 此后, 其他课题组对马来酰亚胺的结构进行调整(如在基团 R 连接芳基^[28]或者 β -氨基基团^[29]), 避免了逆迈克尔加成反应的发生, 并且促进水解反应生成稳定的产物, 从而防止连接物从多肽和蛋白质 Cys 上脱除^[30].



图式 8 马来酰亚胺-巯基偶联产物的开环以及巯基交换
Scheme 8 Ring opening of maleimide-thiol conjugates and thiol-exchange

2019 年, 王炜、曹毅课题组^[31]在使用马来酰亚胺-巯基偶联方法稳定蛋白质方面取得了突破. 该研究组使用基于原子力显微镜的单分子力谱技术发现马来酰亚胺与巯基结合后通过力学拉伸可以促进产物开环, 极大

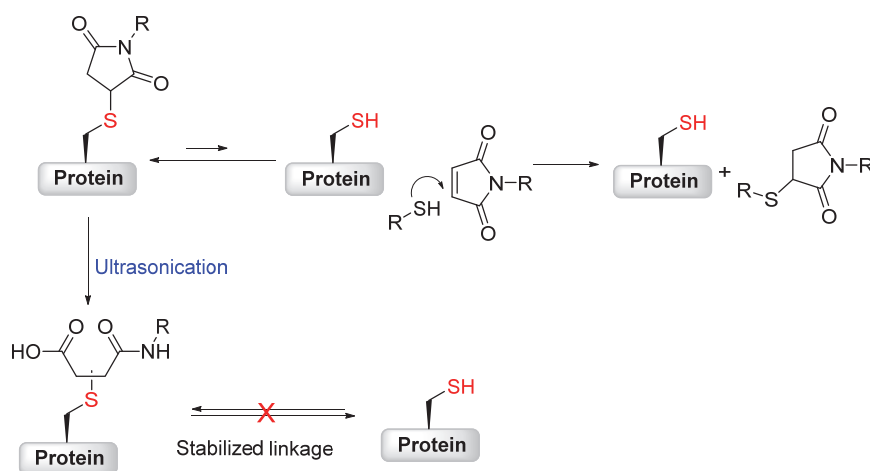
地稳定了马来酰亚胺与巯基的偶联产物(Scheme 9), 将这一简单生化偶联手段用于蛋白质的稳定修饰.

3 与 α,β 不饱和羰基化合物反应

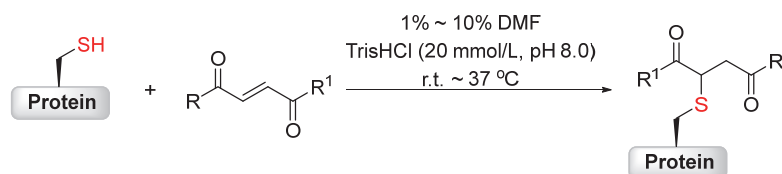
为了发展优于马来酰亚胺的连接子, 化学家们陆续开发了一系列基于 Cys 和 α,β 不饱和羰基化合物的迈克尔加成反应.

2016 年, Bernardes 课题组^[32]对不饱和羰基化合物进行了合理化设计, 发现 3-苯甲酰基丙烯酸酯类化合物与 Cys 的巯基在生理条件下发生迈克尔加成反应生成了稳定的产物(Scheme 10). 当这些不饱和羰基化合物连接有荧光基团或者聚乙二醇(PEG)等时, 它们可以对蛋白质和抗体进行功能化修饰. 修饰产物在血浆和谷胱甘肽中表现出足够的稳定性. 同时, 他们计划将这种巯基修饰的方法应用到活体细胞中进行下一步研究.

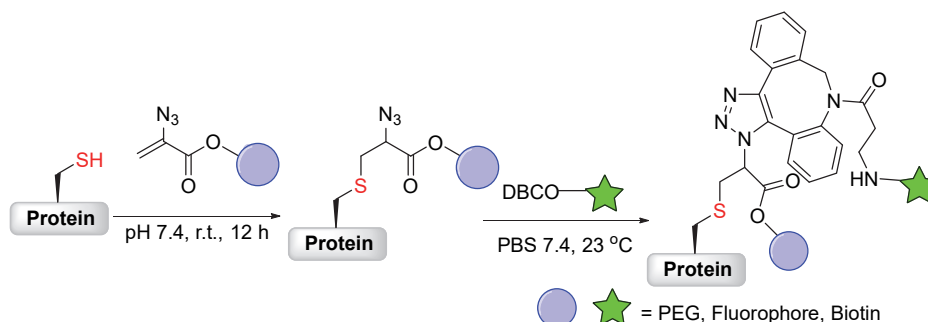
2017 年, Chiba 课题组^[33]开发了一种新的巯基修饰试剂 2-叠氮丙烯酸酯, 该试剂不仅可以对多肽和蛋白质的 Cys 进行选择性的修饰, 其叠氮基团可以进一步和连有荧光基团或者药物分子的炔烃化合物通过“点击化学”(click 反应)进行偶联, 从而进行二次修饰(Scheme 11). 随后, 他们对含一个 Cys 的牛血清蛋白(BSA)进行了修饰.



图式 9 通过物理拉伸稳定巯基和马来酰亚胺的加成产物
Scheme 9 Maleimide-thiol adducts stabilized through stretching



图式 10 羰基丙烯酸酯类试剂对多肽和蛋白质 Cys 的不可逆修饰
Scheme 10 Irreversible modification of polypeptide and protein Cys using carbonylacrylic reagents



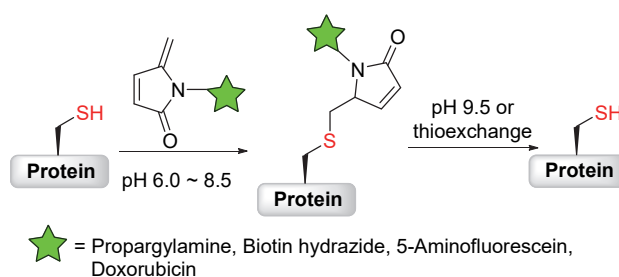
图式 11 2-叠氮丙烯酸酯作为多肽和蛋白质 Cys 修饰的双功能试剂

Scheme 11 2-Azoacrylates as bifunctional reagents for peptide and protein Cys modification

2017 年, 席真、周传政团队^[34]报道了 5-亚甲基吡咯酮(5-MPs)作为 Cys 修饰试剂(Scheme 12), 5-MPs 的反应特异性好. 他们还发现 5-MPs 和蛋白质的偶联产物可以在 pH 9.5 或者强亲核性的硫醇存在下发生逆迈克尔加成反应, 实现无痕脱除, 因此, 该方法可应用于蛋白质的动态修饰.

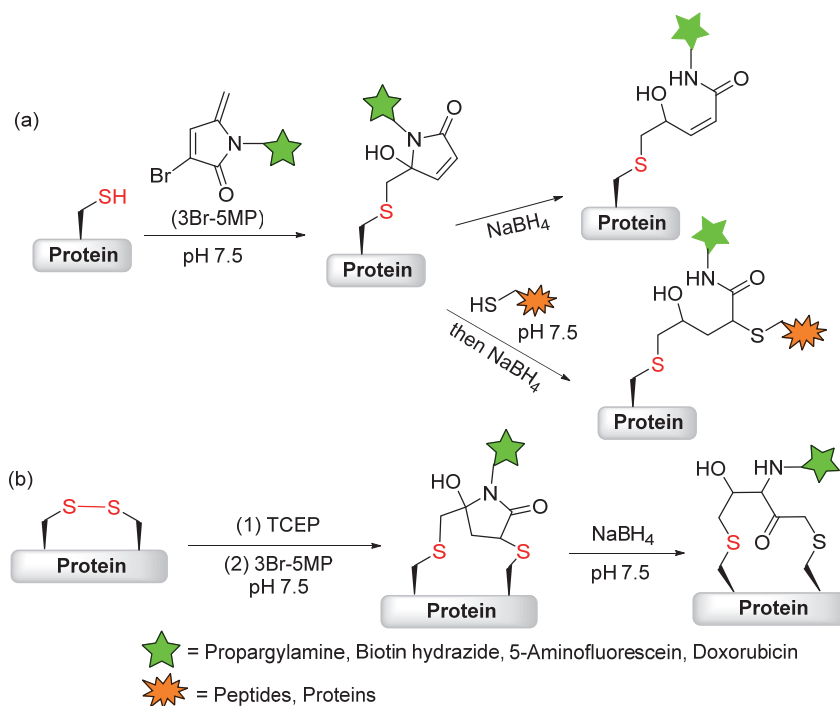
2020 年, 席真、周传政团队^[35]将 5-MPs 的结构调整为 3-溴-5-亚甲基吡咯酮(3Br-5MPs). 3Br-5MPs 在与一分子多肽或者蛋白质半胱氨酸进行加成后, 其加成产物还可进一步和另一分子硫醇或者半胱氨酸进行加成(Scheme 13). 与此同时, 3Br-5MPs 还可以和含两个巯基的多肽链反应生成二硫桥环偶联产物. 这些加成产物在硼氢化钠(NaBH_4)还原下可以生成稳定的产物, 这使得

3Br-5MPs 成为一种高效并且有价值的多功能巯基修饰试剂和订书肽的偶联试剂.



图式 12 5-亚甲基吡咯酮作为高选择性且可无痕脱除的蛋白质巯基修饰试剂

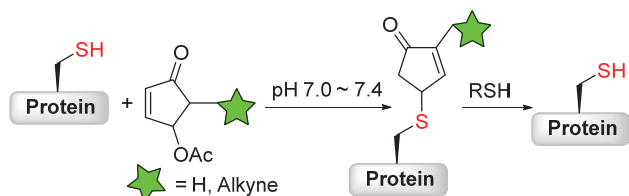
Scheme 12 5-Methylene pyrrolidone as a highly selective and traceless protein Cys modification reagent



图式 13 3-溴-5-亚甲基吡咯酮作为选择性蛋白质 Cys 多官能团化和二硫桥环化的修饰试剂

Scheme 13 3-Bromo-5-methylene pyrrolones as cysteine-specific protein multi-functionalization and disulfide rebridging

2018 年, 尹正课题组^[36]发展了一种高活性的巯基修饰试剂 4-取代环戊烯酮(Scheme 14). 该试剂通过迈克尔加成反应和蛋白质巯基发生反应, 快速形成较为稳定的加成产物. 加成产物可以在迈克尔供体的存在下实现无痕脱除, 并且该课题组成功实现了对泛素调节素 X 域(UBXD)、血红素转运蛋白 1、肠道病毒 71 型 3c 蛋白酶以及 MERS 冠状病毒 3C 样蛋白酶等蛋白质的动态修饰, 充分展现了该方法的实用性.



图式 14 4-取代环戊烯酮作为高活性且可以无痕脱除的蛋白质巯基修饰试剂

Scheme 14 4-Substituted cyclopentenone as a highly active and traceless protein thiol modification reagent

2018 年, 姜标课题组^[37]发现 *N*-甲基-*N*-苯基乙烯基磺酰胺可以选择性地和蛋白质上的巯基反应(Scheme

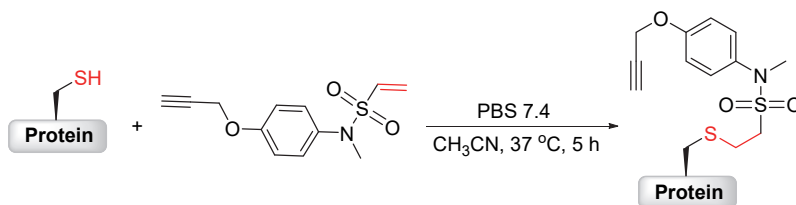
15), 并将该反应应用到 ADCs 合成中, ADCs 上的抗体药物比例可以通过调整连接子缺电子程度的强弱和连接子(linker)的亲水性来调节.

2019 年, 王欢课题组^[10c]发现 1,4-二硝基咪唑可以作为高效高选择性的双功能多肽修饰试剂(Scheme 16, a). 在酸性至中性条件下, 1,4-二硝基咪唑选择性地和 Cys 反应形成稳定的偶联产物, 可以作为多肽和蛋白质的修饰试剂. 值得注意的是, 在中性条件下 1,4-二硝基咪唑与 Lys 的氨基不反应, 而在碱性有机溶剂中 1,4-二硝基咪唑可以与氨基发生反应. 这种独特的反应性能随后被应用到多肽的双环化修饰中(Scheme 16, b).

4 与炔基化合物反应

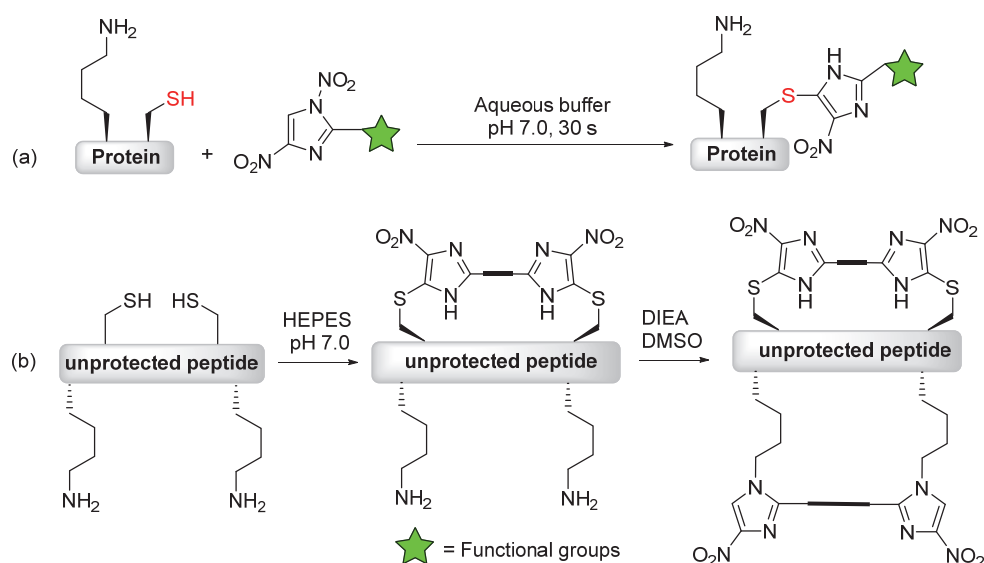
传统的炔烃和巯基的反应一般指的是自由基引发剂引发的巯基-炔烃自由基加成反应(thio-yne reaction)^[38]. 而近年来一些新型的炔烃和 Cys 巯基反应则是利用炔烃的缺电子效应在接近生理条件下完成的.

2013 年, Waser 课题组^[39]发展了一种高价碘炔基试剂(TIPS-EBX)来实现巯基-炔基化反应(Scheme 17, a). 该反应无需过渡金属催化, 在温和的条件下即可高效完



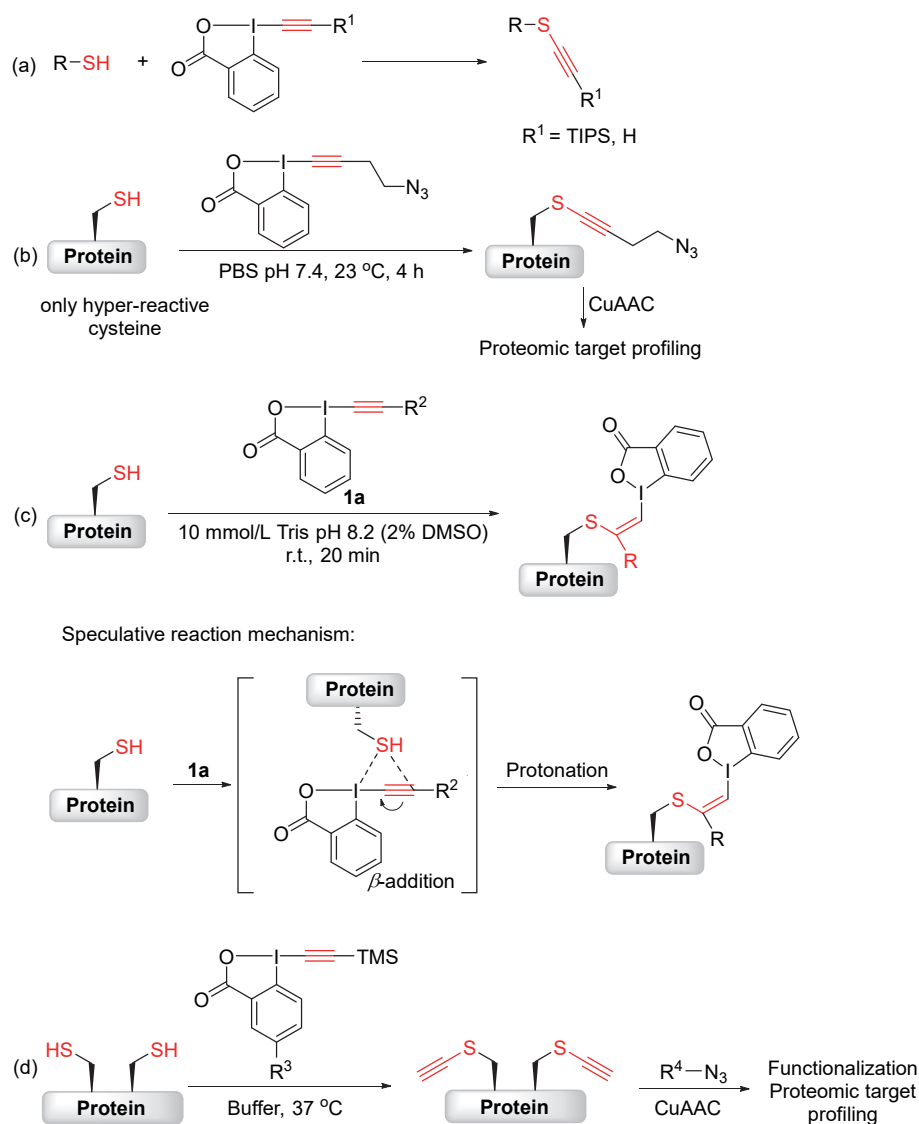
图式 15 *N*-甲基-*N*-苯基乙烯基磺酰胺选择性地和巯基生物偶联

Scheme 15 *N*-Methyl-*N*-phenylvinylsulfonamides for cysteine-selective conjugation



图式 16 二硝基吡唑作为双功能生物偶联试剂在蛋白质修饰和多肽环化中的应用

Scheme 16 Dinitroimidazoles as bifunctional bioconjugation reagents for protein modification and peptide macrocyclization



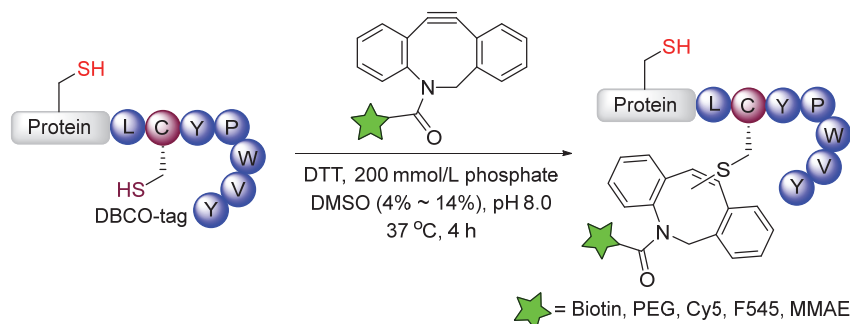
图式 17 含炔基高价碘试剂对多肽和蛋白质的功能化

Scheme 17 Alkynyl hypervalent iodine-mediated peptide and protein functionalization

成。即使在含有其它活性基团时,该试剂也可以选择性地和巯基反应。该课题组^[40]将巯基-炔基化反应应用到蛋白质的化学修饰中(Scheme 17, b),修饰后的蛋白质上带有的炔基可以进一步发生 click 反应,这为蛋白质组学和新药的开发提供了新方法和工具。但是该方法的局限性在于只有暴露在蛋白表面的 Cys 才能和炔基高价碘试剂反应。2018 年, Waser 课题组^[41]将该炔基高价碘试剂和巯基的反应条件进行了调整(如反应液的 pH 等),解决了高价碘试剂(EBX)试剂和巯基的反应活性问题(Scheme 17, c)。含有叠氮官能团的 EBX 试剂和巯基发生加成反应形成稳定的产物,该产物可以进一步发生 Suzuki-Miyaura 偶联和 Click 反应。2020 年,该课题组^[42]进一步拓展了高价碘试剂的应用。他们使用三甲基硅基

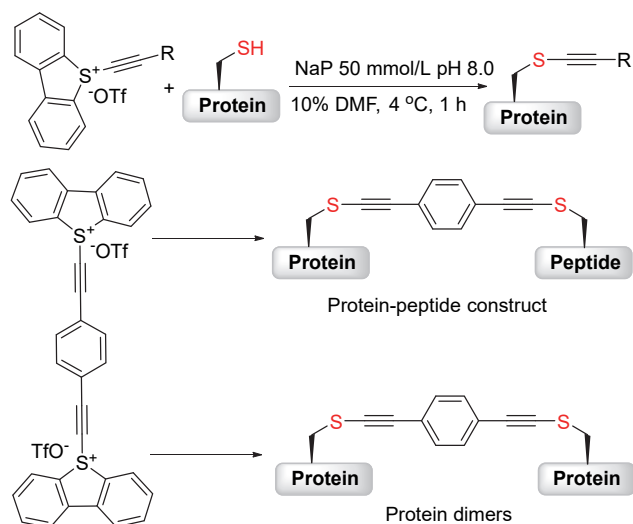
保护的高价碘试剂实现了对多肽和蛋白质巯基的乙炔化,他们不但进行了体外实验,还在活细胞中进行了探索。最近, Waser 课题组^[43]将高价碘试剂用于订书肽的合成(Scheme 17, d),丰富了高价碘试剂在多肽和蛋白质修饰中的应用。

2018 年, Pentelute 课题组^[44]报道了一种位点选择性的 Cys 和环辛炔衍生物的偶联反应(Scheme 18)。值得注意的是,该反应是环辛炔衍生物和蛋白质上 C 端或者 N 端的七肽序列(DBCO-tag, Leu-Cys-Tyr-Pro-Trp-Val-Tyr)的加成反应,其反应速度是其它位置上 Cys 反应速度的 220 倍。他们利用该反应对绿色荧光蛋白和抗体曲妥单抗进行了修饰。这项研究表明水相中特定的短肽序列可以加速反应的完成。



图式 18 位点选择性的半胱氨酸-环辛炔衍偶联
Scheme 18 Site-selective cysteine-cyclooctyne conjugation

在 Waser 课题组的基础上, Bernardes 课题组^[45]在 2021 年发展了一种 5-炔基二苯并噻吩硫鎓-三氟甲磺酸盐作为新型的多肽巯基修饰试剂(Scheme 19). 该试剂和多肽或蛋白质通过亲电炔基化反应进行偶联. 此外, 他们还制备了双炔基试剂, 可以实现二次硫-炔基化, 并将这个反应应用到多肽-蛋白质和蛋白质-蛋白质的连接中.



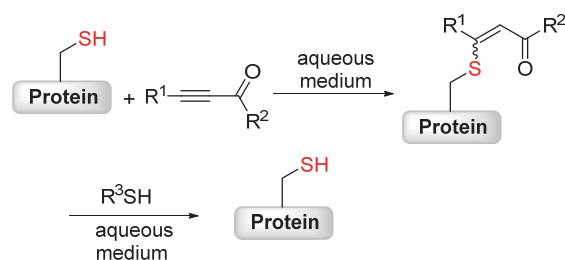
图式 19 5-(炔基)二苯并噻吩硫鎓-三氟甲磺酸盐通过亲电炔基化反应对蛋白质巯基的修饰

Scheme 19 Protein cysteine modification by electrophilic alkylation using 5-(alkynyl)dibenzothiophenium triflates

缺电子炔烃由于其独特的性质可以和巯基等亲核试剂发生加成反应^[46]. Arjona 课题组^[47]报道了甲基磺酰基炔烃可作为一种可切除的巯基保护基团, 该结构是由甲基磺酰基乙炔和巯基反应生成的. 随后他们测试了该反应的化学选择性, 他们发现在有硫醇、醇以及酚同时存在时, 甲基磺酰基乙炔可以选择性地和硫醇反应. 0 °C 下, 甲基磺酰基乙炔和 Boc-Cys-OMe 在有机溶剂中的反应具有较高的转化率和区域选择性(100%, 98 : 2 Z : E, CH₃CN/CF₃CH₂OH)^[48]. 由于该反应均在有机溶

剂中进行, 因此很难直接用于多肽蛋白质修饰.

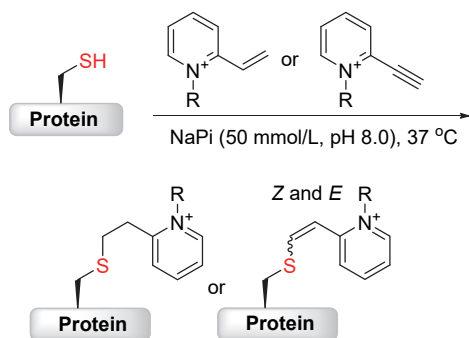
2009 年, 支志明课题组^[49]发展了一种缺电子炔烃在水相中对多肽和蛋白质 Cys 修饰的方法(Scheme 20). 他们系统研究了炔酮、炔基酰胺以及炔基酯对反应活性以及化学选择性的影响. 实验结果表明, 反应活性为端基炔酮 >> 内炔酮 ≈ 炔基酯 > 炔基酰胺. 在研究区域选择性时, 他们发现 Z 构型的产物偏多, 并且炔烃上连接的基团吸电子能力越弱, Z 构型的产物就越多. 同时他们发现在其它巯基亲核试剂存在的条件下, 修饰产物会被还原成 SH 状态.



图式 20 缺电子炔烃作为可脱除的蛋白质巯基修饰试剂
Scheme 20 Electron-deficient alkynes as cleavable reagents for protein cysteine modification

2019 年, Bernardes 课题组^[50]使用季铵盐化的烯基和炔基吡啶化合物作为多肽和蛋白质 Cys 修饰试剂(Scheme 21). 这两种修饰试剂反应活性很高, 4 min 就可以完成 80% 以上的转化, 在 1 h 内可以完全转化. 由于季铵盐化的炔基吡啶化合物和巯基加成会有异构体生成, 他们最后选择季铵盐化的烯基炔吡啶化合物来进行后续更加复杂的多肽和蛋白质以及抗体修饰.

Staudinger 反应是有机叠氮化合物和三价磷反应得到相应的氮杂磷叶立德(磷亚胺)的反应. 在此基础上, Hackenberger 课题组^[51]首次报道了 Staudinger-Phosphonite (SPhR)反应. 该反应利用芳基膦酸盐选择性地和含叠氮的多肽和蛋白质反应, 从而实现了对多肽和蛋白质的化学修饰.



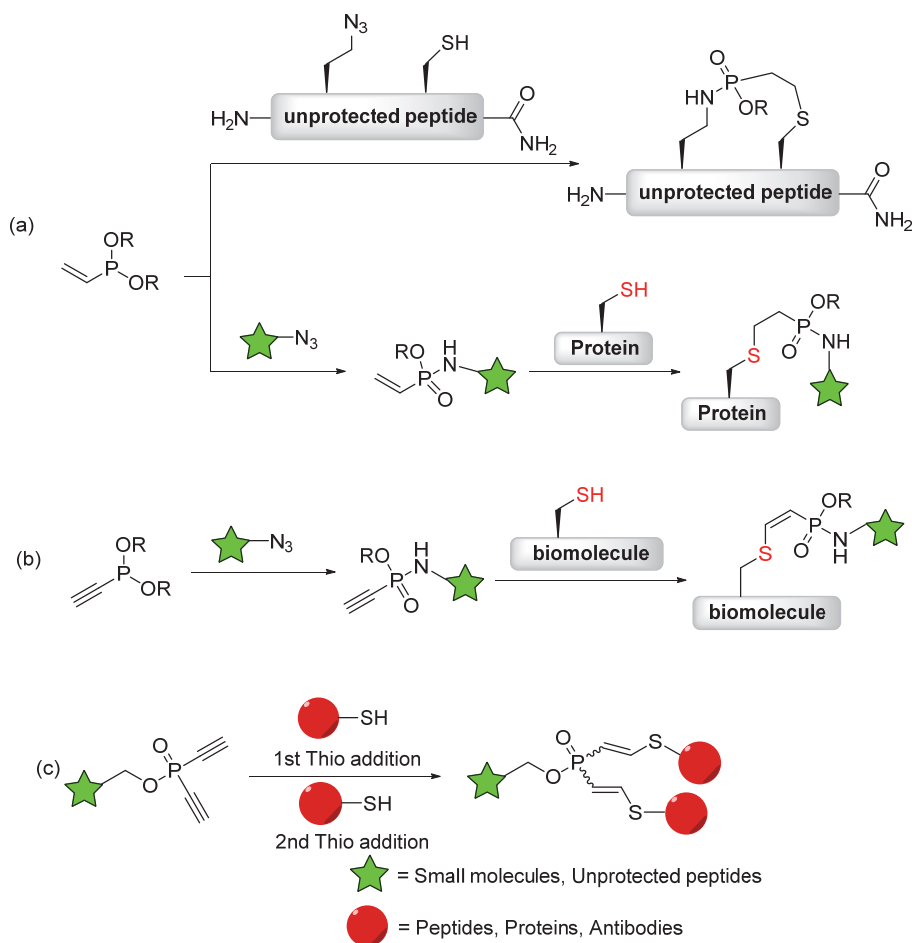
图式 21 季铵盐化的烯烃和炔基吡啶化合物对多肽和蛋白质 Cys 的修饰

Scheme 21 Quaternization of vinyl/alkynyl pyridine for the modification of cysteine-containing peptides

2021 年, Hackenberger 课题组^[52]利用 SPhR 反应发展了一种新的 Cys 修饰方法. 由于磷酸胺基团的拉电子作用, 缺电子的乙炔基可以与 Cys 选择性反应, 得到一系列以 Z 式构型为主的加成产物, 实现了对多肽和蛋白质的选择性修饰(Scheme 22, a). 利用这种方法, 他们将

连有 Cy5 荧光基团的乙炔基磷酸胺和曲妥珠单抗(抗 Her 2 的单克隆抗体)进行偶联, 得到抗体-荧光团偶联物(AFC). 与此同时, 他们课题组又开发了乙炔基磷酸胺^[53]作为选择性的多肽和蛋白质 Cys 修饰试剂(Scheme 22, b). 基于乙炔基磷酸胺和巯基的加成产物在人血清蛋白和细胞裂解产物中展现出良好的稳定性, 2019 年, 该课题组^[54]使用亲水性的乙炔基磷酸胺作为连接子来合成 ADCs. 他们使用天然非编码的曲妥珠单抗和本妥昔单抗作为抗体, 合成了数个 ADCs. 该方法提供了一种基于 Cys 模块化反应的下一代癌症疗法思路, 这些 ADCs 展现出了高稳定性和生物体内的抗肿瘤活性.

2021 年, Hackenberger 课题组^[55]又发展了一类二乙炔基磷酸盐试剂, 此类试剂可以对两分子的蛋白质 Cys 进行修饰, 并且利用该试剂构建二硫桥环(Scheme 22, c). 这种试剂可以在与多肽或蛋白质 Cys 完成第一次加成反应后, 紧接着和另一个含 Cys 的生物分子(如抗体)反应, 从而实现两个含有 Cys 的不同生物分子的偶联. 从核磁谱图中发现, 最终产物的 Z-Z, E-Z 以及 E-E

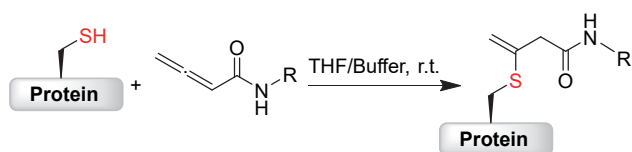


图式 22 乙炔基磷酸盐和二乙炔基磷酸盐在多肽和蛋白质功能化方面的应用

Scheme 22 Application of ethynyl phosphonamidate and diethynyl phosphinates for peptide and protein functionalization

异构体的比例为 45 : 50 : 5。随后, 他们发现 *Z-Z* 和 *E-Z* 构型的异构体会向着 *E-E* 构型的产物异构化。该修饰方法虽然会有多种顺反异构的产物生成, 但这种多功能性的乙基二乙炔基膦酸酯试剂为蛋白质-蛋白质相互作用及生物医药等方向的研究提供了新思路。

尽管炔烃化合物对蛋白质 Cys 的修饰反应十分高效, 它们的产物往往会受到顺反异构问题的困扰。为了解决该问题, 2014 年, Loh 与 Xing 团队^[56]成功地将联烯酰胺发展成为一种新的巯基修饰试剂, 并实现了多肽和蛋白质的 Cys 选择性修饰(Scheme 23)。该反应在温和条件下即可快速得到稳定且不可逆的加成产物。更重要的是, 修饰产物不会像其它炔烃化合物有产生其它构型的风险。他们利用该策略对牛胰岛素进行了修饰。



图式 23 联烯酰胺作为巯基的选择性修饰试剂

Scheme 23 Allenamides as selective reagents for peptide and protein cysteine modification

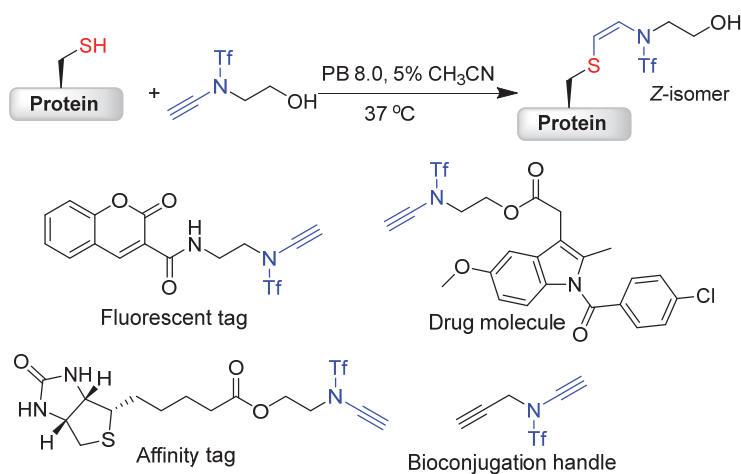
2018 年, 赵军锋课题组^[57]发现炔酰胺在碱性条件下可以充当迈克尔受体, 从而发展了炔酰胺的 β -磷氢化和 β -胺氢化反应。最近, 他们通过对炔酰胺的结构进行合理设计, 在炔酰胺的 N 原子上引入具有强吸电子能力的三氟甲磺酰基, 将富电子的炔酰胺叁键转化为缺电子的叁键, 实现了炔酰胺对巯基的高选择性的 β -加成反应。基于此, 他们发展了一种高化学选择性、高立体选择性且高区域选择性的蛋白质 Cys 化学修饰方法^[58] (Scheme 24)。值得注意的是, 该方法通过 Cys 巯基对缺

电子炔酰胺的 β 位加成, 能够生成构型单一的 *Z*-构型产物。该炔酰胺不仅水溶性好, 且对巯基表现出了极高的反应选择性, 在其它氨基酸侧链上的活泼基团, 如羧基、氨基、羟基、咪唑、吡啶等存在下, 炔酰胺能够高选择性地与巯基反应。炔酰胺 N 上可以连接多个多种功能性基团(如荧光基团、药物基团和生物素等)。与此同时, 炔酰胺和巯基的加成产物在酸、碱以及氧化条件下都表现出了较高的稳定性。随后他们与 Metanis 课题组合作, 使用炔酰胺对泛素(G47C)/牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI)、牛血清蛋白(BSA)以及曲妥珠单抗 (Trastuzumab)进行了修饰。这种温和条件下炔酰胺的 β -硫氢化反应为多肽和蛋白质的化学修饰提供了新工具, 并为药物开发提供了新思路。

5 金属试剂参与的蛋白质半胱氨酸修饰

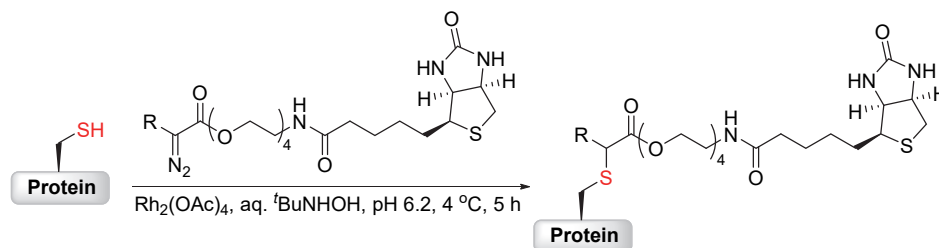
金属试剂参与的反应在有机合成中发挥着极其重要的作用^[59]。然而, 蛋白质等生物大分子所需的相对复杂敏感的生物相容性反应条件与金属试剂参与反应时所需的相对苛刻的反应条件限制了金属试剂直接参与蛋白质修饰的发展。近年来, 随着更加温和与生物相容性好的金属试剂的开发, 一些能用于修饰蛋白质等生物大分子的金属参与的反应陆续被报道^[60]。

Ball 课题组^[61]发展了铑催化的重氮化合物对 Cys 的修饰方法(Scheme 25)。他们在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Rh}(\text{OAc})_2$ 、10 mmol/L tBuNH_2OH 、 $\text{pH}=6.2$ 的条件下, 使用重氮化合物与多肽和蛋白质中的 Cys 进行反应, 得到稳定的产物。为了证实该方法的优越性, 他们对人血浆血清蛋白进行了修饰, 该修饰产物与马来酰亚胺的修饰产物相比展现出了更高的稳定性。



图式 24 炔酰胺作为高选择性的蛋白质 Cys 化学修饰试剂

Scheme 24 Ynamide as high cysteine-selective modification reagent



图式 25 铑催化的重氮化合物对半胱氨酸的修饰

Scheme 25 Rhodium-catalyzed cysteine modification with diazo reagents

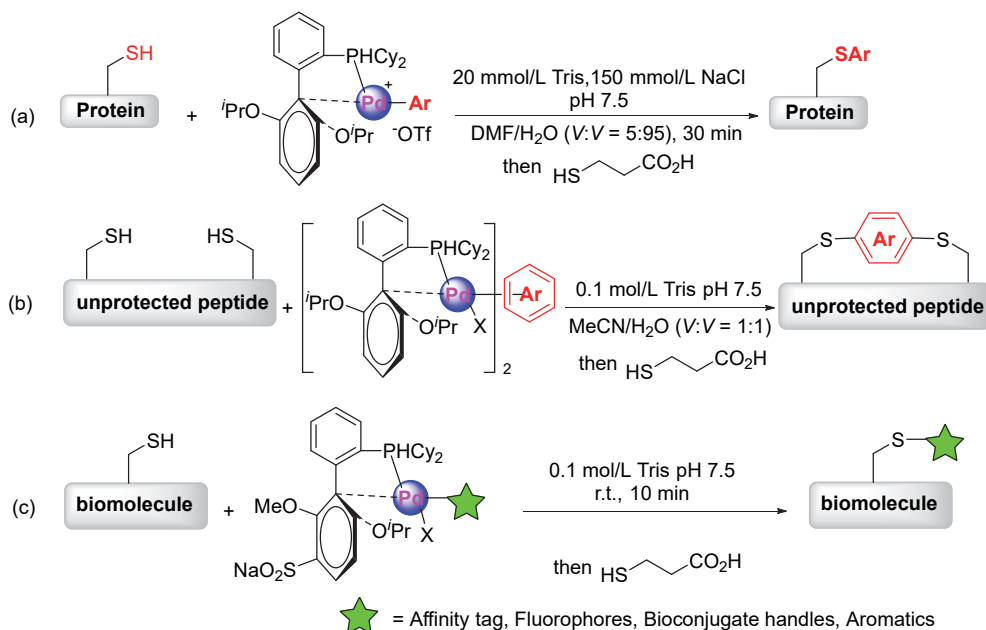
在传统过渡金属催化的反应中, 巯基的存在往往会导致钯催化剂中毒, 从而限制了其在多肽和蛋白质修饰中的应用. 2015 年, Buchwald 和 Pentelute 团队^[62]使用钯催化剂和配体预先形成的稳定的芳基钯试剂, 在 pH 7.5 缓冲溶液中, 与多肽和蛋白质 Cys 上的巯基发生特异性的偶联反应(Scheme 26, a). 该偶联产物在酸、碱以及氧化条件下展现出了良好的稳定性. 2017 年, 他们^[63]对钯试剂的结构进行了改造, 合成出一系列的双有机钯试剂, 这些试剂可以和含两个 Cys 残基的多肽通过环化反应形成订书肽的结构(Scheme 26, b). 这些活性多肽的两个 Cys 残基可以分别位于 $i, i+4$ 和 $i, i+7$. 与此同时, 他们利用碘化的二芳基膦配体(sSPHos)合成了在空气中稳定的水溶性有机钯金属试剂^[64]. 该新型的钯试剂无需助溶剂, 可以直接在水溶液中选择性地对多肽中的 Cys 进行修饰(Scheme 26, c). 不仅如此, 这种有机钯金属试剂还可以连接生物素、荧光基团以及杂环化合物等生物活性基团. 总的来说, Buchwald 和 Pentelute 团队发

展的金属钯试剂对多肽和蛋白质的硫-芳基化反应将金属试剂对多肽和蛋白质的化学修饰方法推向了新高度, 丰富了蛋白质化学修饰的方法库^[65].

2018 年, Spokoyny 和 Maynard 团队^[66]使一价金通过氧化加成形成对空气稳定的三价金试剂, 该试剂可以选择性地对多肽和蛋白质上的 Cys 进行修饰(Scheme 27). 这种硫-芳基化反应十分迅速, 在不同的 pH 范围(0.5~14)内 5 min 即可结束反应. 这种三价金试剂也可以连接各种各样的活性基团, 可以在多肽和蛋白质上引入药物分子、荧光基团以及聚乙二醇等. 与此同时, 芳基双-三价金试剂也可以用于订书肽的合成.

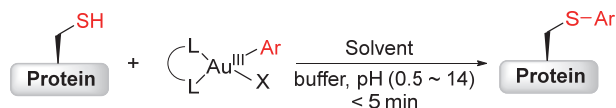
6 光催化的 Cys 修饰

Cys 的修饰除了巯基作为亲核试剂的反应外, 近年来光催化的方法也拓展了多肽和蛋白质 Cys 的修饰方法^[67]. 巯基-烯反应(thiol-ene reaction)通常是由自由基引发剂或者紫外光引发的, 由于其高效的反应特性, 被



图式 26 金属钯试剂对多肽和蛋白质半胱氨酸的芳基化修饰

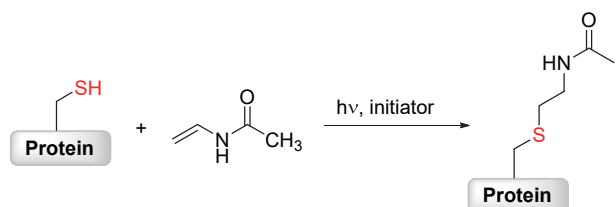
Scheme 26 Palladium reagents for peptide and protein cysteine modification



图式 27 有机金试剂对多肽和蛋白质半胱氨酸的芳基化
Scheme 27 Arylation of peptides and protein cysteine with organometallic gold reagents

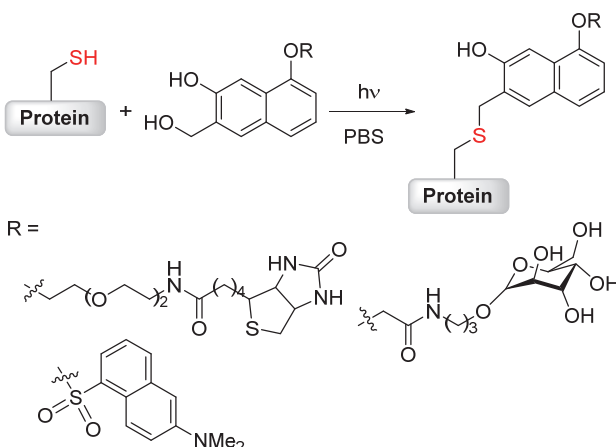
认为是一类新的点击反应, 这类反应也可以通过可见光催化实现蛋白质化学修饰。

2011 年, 刘传法课题组^[68]通过巯基-烯炔反应发展了一种巯基修饰的方法(Scheme 28). 该方法使用 *N*-乙炔基乙酰胺在自由基引发剂、紫外光照的条件下和 Cys 发生反应, 产物是一种 Lys 的类似物, 也可认为是 Lys 类似物的乙酰化产物. 随后, 他们利用该反应对蛋白质进行了泛素化修饰。



图式 28 位点选择性的蛋白质乙酰化
Scheme 28 Site-selective protein acetylation

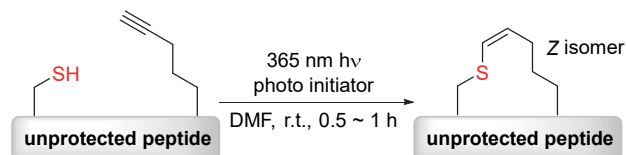
2014 年, Popik 课题组^[69]使用 3-羟甲基-2-萘酚衍生物(NQMPs)在 350 nm 的荧光灯的照射下对多肽和蛋白质进行了选择性修饰(Scheme 29), NQMPs 上可以连接聚乙二醇、生物素、叠氮基团、炔烃以及糖等基团. 产物在稀释溶液(<40 μmol/L)或乙烯基醚存在的情况下通过光照可以实现无痕脱除恢复成未修饰的状态. 随后他们使用该方法对血清蛋白进行了选择性修饰。



图式 29 多肽和蛋白质半胱氨酸的选择性和可逆光化学衍生化

Scheme 29 Selective and reversible photochemical derivatization of cysteine residues in peptides and proteins

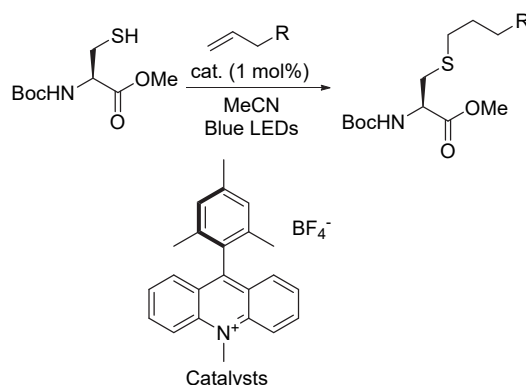
为了更好地研究订书肽在药代动力学上的应用, 2016 年, 李子刚课题组^[70]发展了一种光诱导的巯基-炔反应(Scheme 30). 值得注意的是, 与全烷烃类似物相比, 烯基硫醚键具有更明显的亲脂性和更低的膜毒性。



图式 30 巯基-炔反应在合成订书肽上的应用

Scheme 30 Application of thio-yne reaction in stapled peptide synthesis

2017 年, Wang 课题组^[71]使用烯丙醇类试剂以吡啶鎓类化合物作为光催化剂, 实现了对 Cys 和硫糖的修饰(Scheme 31). 该反应是在光催化剂的作用下产生巯基自由基, 然后巯基自由基进攻烯炔形成新的自由基物种, 未反应的巯基提供质子使自由基物种质子化形成产物, 新形成的巯基自由基进入下一个反应循环. 不过这篇报道只在单个氨基酸和硫糖上面进行了修饰, 并没有扩展到多肽和蛋白质层面。

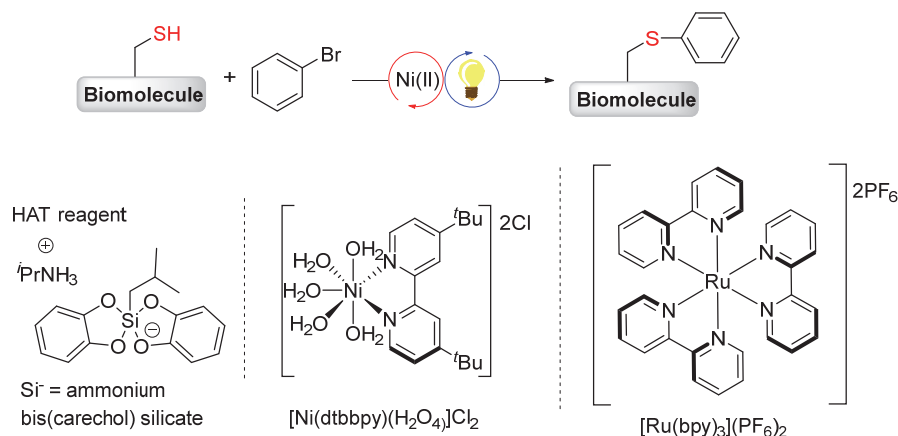


图式 31 可见光介导的光催化剂催化的硫-烯反应

Scheme 31 Visible light mediated thiol-ene reactions catalyzed by organic photoredox catalysis

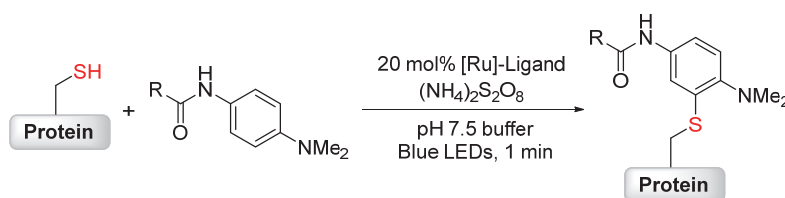
2018 年, Molander 课题组^[72]使用 Ru 作为光催化剂, Ni 作为助催化剂以及硅酸盐作为氢原子转移(HAT)试剂实现了 Cys 的芳基化(Scheme 32). 该反应的选择性和底物适用性都较为广泛, 这两种催化剂的用量可低至 5 mol%, 并可应用于谷胱甘肽和含 Cys 九肽的修饰。

2019 年, Bon 和 Wilson 等课题组^[73]发展了一种配体导向的多肽和蛋白质 Cys 的选择性修饰(Scheme 33). 他们首先利用联吡啶配位的钌催化剂((Ru(II)(bpy)₃)在 LED 光照下对活性多肽 NOXA-B 进行修饰, 1 min 即可完成反应. 随后他们将该反应应用到蛋白质层面上, 对抗凋亡蛋白 MCL-1 286 位上的 Cys 进行了包括荧光和生物素化的多种标记。



图式 32 镍-钌共催化的半胱氨酸芳基化

Scheme 32 Cysteine arylation using dual nickel-ruthenium catalysis



图式 33 蛋白质层面上配体导向的半胱氨酸修饰

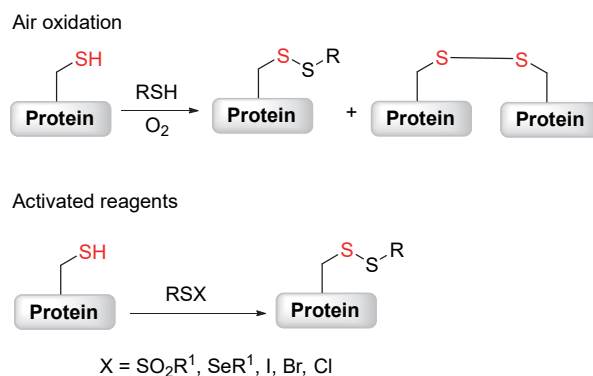
Scheme 33 Ligand directed modification of cysteine at the protein level

7 二硫化物

蛋白质中两个适当位置的半胱氨酸可以通过氧化反应形成分子内二硫键, 在蛋白质折叠及空间结构的稳定性等方面发挥了重要作用^[74]. 同时, 分子间二硫化物的修饰也是一种常用的 Cys 化学修饰方法, 如多肽或蛋白质中的 Cys 和小分子硫醇通过空气氧化形成二硫键是最简单的修饰方法. 然而, 这种氧化方法的缺点是反应速度慢, 并伴随着蛋白质二聚现象的发生. 因此, 科学家们发展了一系列含硫的活化试剂^[75], 实现了分子间二硫键的形成以达到 Cys 修饰的目的. 2016 年, Madder 课题组^[14b]对二硫键形成的相关研究工作进行了系统的总结与展望(Scheme 34).

8 N 端 Cys 的化学修饰

以上基于 Cys 的蛋白质的选择性化学修饰方法大多是在 Cys 和其他氨基酸残基之间的选择. 而含多个 Cys 的多肽和蛋白质的精准修饰可以通过近年来发展的临近标记技术实现, 该技术依赖于具有邻近标记功能的工具酶, 包括过氧化氢酶和生物素连接酶等, 它可与目标蛋白(bait)融合, 实现瞬时或者低亲和性相互作用蛋白的直接捕获. 由于这些酶催化产生的高反应活性小分子具有很短的生命, 因此邻近标记技术具有较高的空间特异性^[76]. 另一方面, Cys 的精准修饰还可以通过肽链特

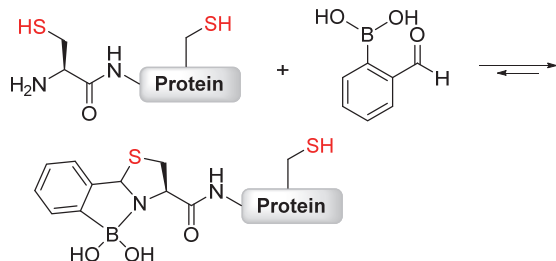


图式 34 形成二硫化物的常用方法

Scheme 34 Common methods for disulfide formation

定序列微环境的不同来实现(Schemes 4, 18). 值得注意的是, N 端半胱氨酸由于在肽链中特殊的位点, 并且含有巯基与氨基两个活性官能团, 通过双官能团化反应实现化学修饰在近年来被广泛应用于特定位点的蛋白质标记、蛋白质的化学合成以及多肽环化等领域.

2016 年, Gois 课题组^[77]利用醛类化合物与 1,2-氨基硫醇反应生成四氢噻唑, 实现了对 N 端 Cys 的特异性修饰. 不过, 该反应在酸性条件下反应速度较慢. 当在苯甲醛的邻位引入硼酸基团(2-FPBA)时, 反应速度会大大提高. 同时, 产物(azolidinoboronate)活性较高, 会随着时间的推移回到未修饰的 N 端 Cys (Scheme 35).

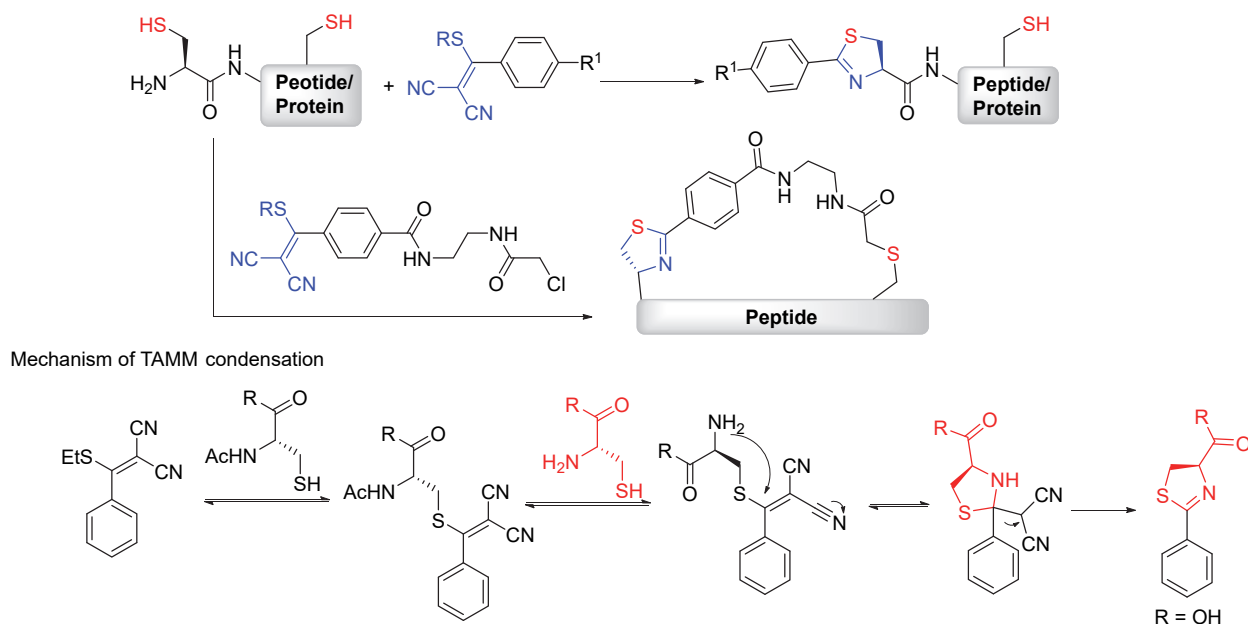


图式 35 2-FPBA 作为选择性的 N 端半胱氨酸修饰试剂

Scheme 35 2-FPBA as selective N-terminal cysteine modification reagent

2020 年, 吴川六课题组^[78]报道了一种 1,2-氨基硫醇在生物相容条件下高效、高选择性地与 2-((烷硫基)(芳基)亚甲基)丙二腈(TAMM)反应的方法(Scheme 36). 该反应经历了巯基交换、环化以及二乙腈消除的独特步骤, 从而得到产物 2-芳基-4,5-二氢噻唑(ADT). 1,2-氨基硫醇可以引入到多肽和蛋白质中作为 N-端 Cys, 从而实现对多肽和蛋白质的精准修饰. 于此同时 TAMM 也可以应用于多肽的环化. 利用该环化方法, 他们发现 ADT 类型的环肽与蛋白质靶点具有高亲和性, 这就为生物研究以及治疗学研究提供了一种潜在的工具.

2021 年, 吴川六课题组^[79]又报道了一种 2-苯基丙烯醛(BAA)与 1,2-氨基硫醇经过醛亚胺缩合、迈克尔加成以及通过 NaBH_3CN 还原亚胺等步骤的高效快速的反应(Scheme 37). 该反应在生理条件下的反应速度达到了 $2700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 同时, 多肽链内部的 Cys 与 Lys 无需保护, BAA 就能选择性地与 N-端 Cys 反应. 当 BAA 上再连接一个巯基修饰试剂时, 还能用于环肽的合成.



图式 36 TAMM 作为 N-端半胱氨酸修饰试剂

Scheme 36 TAMM as N-terminal Cys modification reagent

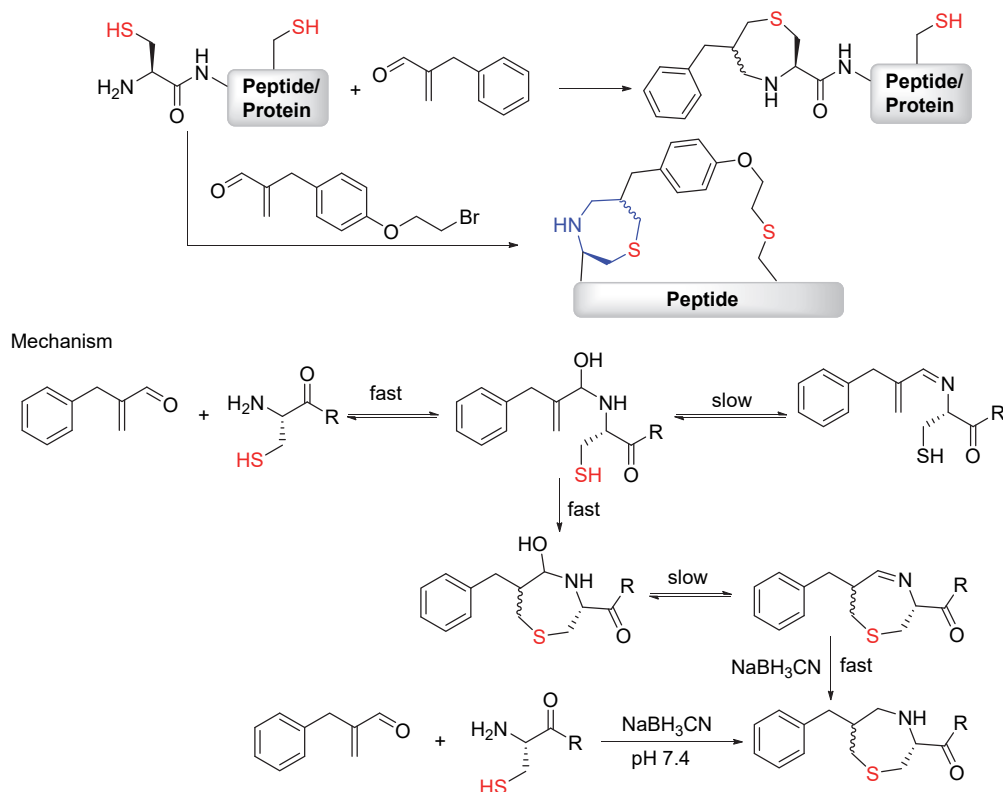
9 其它类型的反应

9.1 铜离子介导的基于硒代半胱氨酸的多肽和蛋白质化学修饰

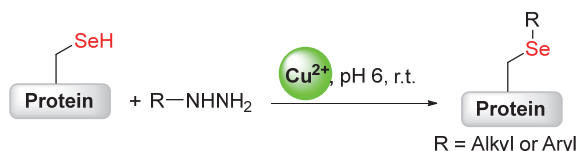
Sec 作为第 21 种天然氨基酸, 其结构与 Cys 很相似, 可作为 Cys 的一种变体^[80]. 然而, 它们的化学性质有明显的不同, Sec 侧链的 SeH 的酸性($\text{pK}_a=5.47$)比 Cys 侧链的 SH ($\text{pK}_a=8.14$)要强, 因此它在生理条件下即可去质子化. 2021 年 Metanis 课题组^[81]发展了一种新的 Sec 化学修饰方法(Scheme 38). 该方法中芳基胂或者烷基胂在二价铜离子的存在下生成芳基或者烷基自由基, 然后和蛋白质上的 SeH 反应生成芳基化或烷基化产物. 他们通过该方法实现了含 Sec 蛋白质的泛素化. 同时, 他们还利用该方法实现了含 Sec 多肽的环化.

9.2 对巯基进行同位素标记

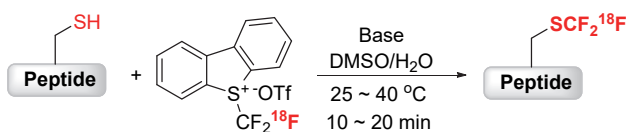
电子发射断层成像技术(Positron Emission Tomography, PET)是将放射性同位素作为示踪物质, 直接注入生物体, 然后在体外从不同角度完成采集和测量生物体内的放射性信息分布, 利用现代计算机技术完成图像重建的三维成像技术. 这项技术的关键是如何在蛋白质等大分子上引入放射性同位素. 2018 年, Kee, Davis 和 Gouverneur 团队^[82]使用 5-(三氟甲基)-二苯并噻吩硫鎓-三氟甲磺酸盐作为同位素 ^{18}F 源, 实现了在多肽 Cys 上的 ^{18}F -三氟甲基化(Scheme 39). 该反应无需过渡金属催化, 在温和的条件下即可化学选择性地和巯基快速反应. 生物分布研究表明, ^{18}F -SCF₃ 模块在生物成像领域是可行的.



图式 37 BAA 作为 N-端半胱氨酸修饰试剂
Scheme 37 BAA as N-terminal Cys modification reagent



图式 38 铜离子介导的基于硒代半胱氨酸的多肽和蛋白质化学修饰
Scheme 38 Copper-mediated modification of selenocysteines in peptides and proteins

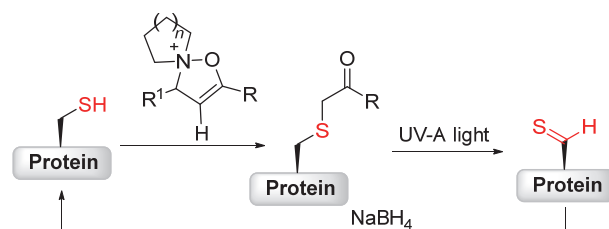


图式 39 多肽的 ^{18}F 三氟甲基化
Scheme 39 ^{18}F -Trifluoromethylation of peptides

9.3 异噻唑啉类试剂

2019 年, Leung 和 Wong 团队^[83]报道了异噻唑啉介导的多肽和半胱氨酸 Cys 修饰. 他们使用化学计量的异噻唑啉试剂和催化量的银试剂, 高效地和多肽 Cys 进行反应(Scheme 40). 基于这种高效的修饰方法, 他们随后对人血清蛋白(HSA)、牛血清蛋白(BSA)以及胰岛素原类似物(BCArg)上的 Cys 巯基进行了高效的修饰. 与此同时, 修饰产物可以在紫外光照的条件下转化为硫醛, 并

且可以在还原条件下转化为原来的巯基, 有望用于蛋白质半胱氨酸的动态修饰.

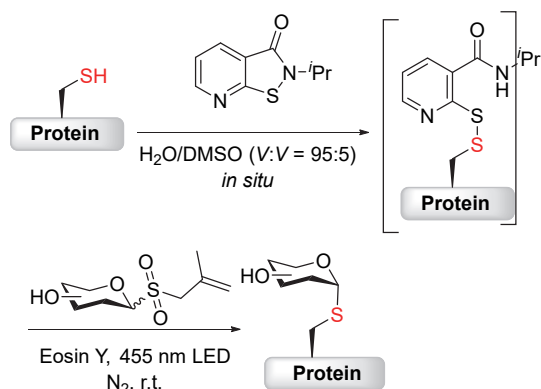


图式 40 异噻唑啉对多肽和蛋白质半胱氨酸的选择性化学修饰
Scheme 40 Cys-selective modification of peptides and proteins using isoxazoliniums

9.4 硫-糖基化试剂

开发高效、高立体选择性方法制备 S-linked 糖肽和糖蛋白具有重要的意义. 最直接的方法应该是对蛋白或者多肽进行直接糖基化. 2021 年, 钮大文课题组^[84]开发了一种新的方法, 实现了多肽和蛋白质高选择性 S-糖基化(Scheme 41). 首先, Cys 上的巯基和异噻唑啉酮原位快速生成二硫化合物, 然后和烯丙基砜糖基供体在光催化的条件下反应, 得到 S-糖基化的产物. 该反应也可以在水相中进行, 并且各种糖基单元都可以兼容此反应, 糖基单元上的羟基也不需要任何保护基. 该方法为糖肽与

糖蛋白的合成提供了一种简单高效的方法。

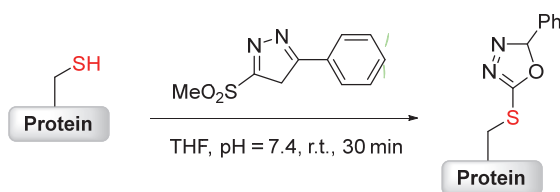


图式 41 不涉及酶的多肽和蛋白质的立体选择性的硫-糖基化

Scheme 41 Nonenzymatic stereoselective S-glycosylation of peptides and proteins

9.5 甲磺酰基苯基噁二唑试剂

2013 年, Barbas III 课题组^[85]利用甲磺酰基苯基噁二唑类试剂在多种反应条件下对多肽和蛋白质 Cys 进行了修饰(Scheme 42). 此外, 在对人类血清蛋白的修饰中, 与马来酰亚胺修饰产物对比, 该修饰产物展现出了良好的稳定性. 这种快速高效的类 click 反应为多肽和蛋白质功能化修饰如聚乙二醇化提供了一种新的工具.



图式 42 甲磺酰基苯基噁二唑类试剂对巯基的化学选择性标记

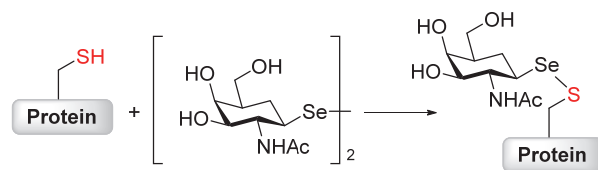
Scheme 42 Chemoselective labeling of thiols with methylsulfonylphenyloxadiazole reagents

9.6 硒-硫连接的糖肽和糖蛋白的合成

硒是一种重要的哺乳动物微量元素, 一般以硒半胱氨酸(SeCys)或硒蛋氨酸(SeMet)的形式存在于蛋白质中. 然而对它们的认识及其代谢研究较少. 2012 年, Davis 课题组^[86]首次报道了通过硒-硫键连接的糖肽和糖蛋白的合成, 并利用该方法合成了人类肝脏硒代谢物 A (Scheme 43). 产物硒-硫化物具有足够的稳定, 可以用原子检测方法定量测定生物体液中的含硒糖缀合物.

10 总结与展望

由于半胱氨酸巯基独特的反应性能, 半胱氨酸的选择性修饰发展迅速, 并且在多肽和蛋白质的化学修饰中占据着十分重要的地位. 近年来 FDA 批准上市的 ADCs



图式 43 硒-硫连接的糖肽和糖蛋白的合成

Scheme 43 Synthesis of selenenylsulfide-linked homogeneous glycopeptides and glycoproteins

药物很多就是基于半胱氨酸位点的官能团化. 总结了近年来一些重要的基于半胱氨酸的多肽和蛋白质的修饰方法, 包括与卤代试剂、马来酰亚胺、 α,β -不饱和试剂、炔烃类化合物、金属试剂和二硫化物等试剂反应, 光催化的 Cys 修饰以及 N 端 Cys 的修饰等. 然而, 这些新方法还有待进行深入研究, 不过, 有些化学修饰方法还存在一些不足, 如化学选择性和立体选择性不强(如马来酰亚胺及其衍生物在和巯基加成后会产生手性中心, 后续合成的 ADCs 药物将存在两种构型, 是否会产生副作用还未可知; 有的炔烃类修饰试剂与巯基加成后产生两种构型的产物)、反应效率不够高以及底物应用范围小等诸多问题. 同时, 更多能够对多肽和蛋白质 Cys 进行单点精准选择性修饰的方法还有待进一步开发. 相信在未来的研究中, 会有更多有价值的基于半胱氨酸的化学选择性修饰方法被开发出来, 为新型 ADCs 的开发、蛋白质检测技术的发展以及其它化学生物学领域的探究提供新工具.

References

- [1] Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J. Jr. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342.
- [2] Chatterjee, S.; Moon, S.; Hentschel, F.; Gilmore, K.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11942.
- [3] Bucci, M. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 525.
- [4] Diallo, I.; Seve, M.; Cunin, V.; Minassian, F.; Poisson, J.-F.; Michelland, S.; Bourgoignie-Voillard, S. *Expert Rev. Proteomics* **2019**, *16*, 139.
- [5] Doerr, A. *Nat. Med.* **2018**, *15*, 651.
- [6] Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
- [7] Kennedy, P. J.; Oliveira, C.; Granja, P. L. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *177*, 129.
- [8] Lawrence, P. B.; Price, J. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 88.
- [9] Schlatter, T.; Kriegesmann, J.; Schroder, H.; Trobe, M.; Lembacher-Fadum, C.; Santner, S.; Kravchuk, A. V.; Becker, C. F. W.; Breinbauer, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14931.
- [10] (a) Yang, M.-Y.; Chen, P. *Acta Chim. Sinica* **2015**, *73*, 783 (in Chinese). (杨麦云, 陈鹏, 化学学报, **2015**, *73*, 783.)
(b) Zheng, Y.; Zhai, L.; Zhao, Y.; Wu, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15094.
(c) Luo, Q.; Tao, Y.; Sheng, W.; Lu, J.; Wang, H. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 142.
(d) Zhang, Y.; Zhang, Q.; Wong, C. T. T.; Li, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 12274.
(e) Zhang, Q.; Zhang, Y.; Liu, H.; Chow, H. Y.; Tian, R.; Eva Fung, Y. M.; Li, X. *Biochemistry* **2020**, *59*, 175.
(f) Zhao, K.; Lim, Y.-J.; Liu, Z.; Long, H.; Sun, Y.; Hu, J.-J.; Zhao,

- C.; Tao, Y.; Zhang, X.; Li, D.; Li, Y.-M.; Liu, C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 20305.
- (g) Wang, S.; Zhou, Q.; Chen, X.; Luo, R.-H.; Li, Y.; Liu, X.; Yang, L.-M.; Zheng, Y.-T.; Wang, P. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2257.
- [11] Chambers, I.; Frampton, J.; Goldfarb, P.; Affara, N.; McBain, W.; Harrison, P. R. *EMBO J.* **1986**, *5*, 1221.
- [12] Giles, N. M.; Watts, A. B.; Giles, G. I.; Fry, F. H.; Littlechild, J. A.; Jacob, C. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 677.
- [13] Marino, S. M.; Gladyshev, V. N. *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 902.
- [14] (a) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem.-Asian J.* **2009**, *4*, 630.
(b) Gunnoo, S. B.; Madder, A. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 529.
(c) Ochrop, P.; Hackenberger, C. P. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *58*, 28.
- [15] Goddard, D. R.; Michaelis, L. *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 361.
- [16] Nielsen, M. L.; Vermeulen, M.; Bonaldi, T.; Cox, J.; Moroder, L.; Mann, M. *Nat. Med.* **2008**, *5*, 459.
- [17] Zhang, C.; Vinogradova, E. V.; Spokoyny, A. M.; Buchwald, S. L.; Pentelute, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 4810.
- [18] Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346.
- [19] Spokoyny, A. M.; Zou, Y.; Ling, J. J.; Yu, H.; Lin, Y. S.; Pentelute, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5946.
- [20] Zhang, C.; Spokoyny, A. M.; Zou, Y.; Simon, M. D.; Pentelute, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 14001.
- [21] Zhang, C.; Welborn, M.; Zhu, T.; Yang, N. J.; Santos, M. S.; Van Voorhis, T.; Pentelute, B. L. *Nat. Chem.* **2015**, *8*, 120.
- [22] Embaby, A. M.; Schoffelen, S.; Kofoed, C.; Meldal, M.; Diness, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 8022.
- [23] Bell, O.; Tiwari, V. K.; Thoma, N. H.; Schubeler, D. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 554.
- [24] Chu, G.-C.; Pan, M.; Li, J.; Liu, S.; Zuo, C.; Tong, Z.-B.; Bai, J.-S.; Gong, Q.; Ai, H.; Fan, J.; Meng, X.; Huang, Y.-C.; Shi, J.; Deng, H.; Tian, C.; Li, Y.-M.; Liu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3654.
- [25] Diamantis, N.; Banerji, U. *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 362.
- [26] Walsh, S. J.; Bargh, J. D.; Dannheim, F. M.; Hanby, A. R.; Seki, H.; Counsell, A. J.; Ou, X.; Fowler, E.; Ashman, N.; Takada, Y.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J. S.; Carroll, J. S.; Spring, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 1305.
- [27] (a) Tedaldi, L. M.; Smith, M. E.; Nathani, R. I.; Baker, J. R. *Chem. Commun.* **2009**, 6583.
(b) Kang, M. S.; Kong, T. W. S.; Khoo, J. Y. X.; Loh, T.-P. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13613.
- [28] Christie, R. J.; Fleming, R.; Bezabeh, B.; Woods, R.; Mao, S.; Harper, J.; Joseph, A.; Wang, Q.; Xu, Z.-Q.; Wu, H.; Gao, C.; Dimasi, N. *J. Controlled Release* **2015**, *220*, 660.
- [29] Lyon, R. P.; Setter, J. R.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Hunter, J. H.; Anderson, M. E.; Balasubramanian, C. L.; Duniho, S. M.; Leiske, C. I.; Li, F.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059.
- [30] Ravasco, J.; Faustino, H.; Trindade, A.; Gois, P. M. P. *Chem.-Eur. J.* **2019**, *25*, 43.
- [31] Huang, W.; Wu, X.; Gao, X.; Yu, Y.; Lei, H.; Zhu, Z.; Shi, Y.; Chen, Y.; Qin, M.; Wang, W.; Cao, Y. *Nat. Chem.* **2019**, *11*, 310.
- [32] Bernardim, B.; Cal, P. M.; Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martinez-Saez, N.; Albuquerque, I. S.; Perkins, E.; Corzana, F.; Burdoloso, A. C.; Jimenez-Oses, G.; Bernardes, G. J. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13128.
- [33] Ariyasu, S.; Hayashi, H.; Xing, B.; Chiba, S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 897.
- [34] Zhang, Y.; Zhou, X.; Xie, Y.; Greenberg, M. M.; Xi, Z.; Zhou, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6146.
- [35] Zhang, Y.; Zang, C.; An, G.; Shang, M.; Cui, Z.; Chen, G.; Xi, Z.; Zhou, C. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1015.
- [36] Yu, J.; Yang, X.; Sun, Y.; Yin, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 11598.
- [37] Huang, R.; Li, Z.; Sheng, Y.; Yu, J.; Wu, Y.; Zhan, Y.; Chen, H.; Jiang, B. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6526.
- [38] Hoogenboom, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3415.
- [39] (a) Frei, R.; Waser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9620.
(b) Frei, R.; Wodrich, M. D.; Hari, D. P.; Borin, P.-A.; Chauvier, C.; Waser, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16563.
- [40] Abegg, D.; Frei, R.; Cerato, L.; Prasad Hari, D.; Wang, C.; Waser, J.; Adibekian, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 10852.
- [41] Tessier, R.; Ceballos, J.; Guidotti, N.; Simonet-Davin, R.; Fierz, B.; Waser, J. *Chem* **2019**, *5*, 2243.
- [42] Tessier, R.; Nandi, R. K.; Dwyer, B. G.; Abegg, D.; Sornay, C.; Ceballos, J.; Erb, S.; Cianferani, S.; Wagner, A.; Chaubet, G.; Adibekian, A.; Waser, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 10961.
- [43] (a) Ceballos, J.; Grinhagena, E.; Sangouard, G.; Heinis, C.; Waser, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 9022.
(b) Ceballos, J.; Grinhagena, E.; Sangouard, G.; Heinis, C.; Waser, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 9022.
(c) Allouche, E. M. D.; Grinhagena, E.; Waser, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 2.
- [44] Zhang, C.; Dai, P.; Vinogradov, A. A.; Gates, Z. P.; Pentelute, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 6459.
- [45] Laserna, V.; Istrate, A.; Kafuta, K.; Hakala, T. A.; Knowles, T. P. J.; Alcarazo, M.; Bernardes, G. J. L. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 1570.
- [46] Truce, W. E.; Tichenor, G. J. W. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2391.
- [47] Arjona, O.; Iradier, F.; Medel, R.; Plumet, J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6090.
- [48] Arjona, O.; Medel, R. o.; Rojas, J.; Costa, A. M.; Vilarasa, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6369.
- [49] Shiu, H. Y.; Chan, T. C.; Ho, C. M.; Liu, Y.; Wong, M. K.; Che, C. M. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 3839.
- [50] Matos, M. J.; Navo, C. D.; Hakala, T.; Ferhati, X.; Guerreiro, A.; Hartmann, D.; Bernardim, B.; Saar, K. L.; Companon, I.; Corzana, F.; Knowles, T. P. J.; Jimenez-Oses, G.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 6640.
- [51] Vallee, M. R.; Majkut, P.; Wilkening, I.; Weise, C.; Muller, G.; Hackenberger, C. P. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5440.
- [52] (a) Kasper, M. A.; Glanz, M.; Stengl, A.; Penkert, M.; Klenk, S.; Sauer, T.; Schumacher, D.; Helma, J.; Krause, E.; Cardoso, M. C.; Leonhardt, H.; Hackenberger, C. P. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 11625.
(b) Park, Y.; Baumann, A. L.; Moon, H.; Byrne, S.; Kasper, M. A.; Hwang, S.; Sun, H.; Baik, M. H.; Hackenberger, C. P. R. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 8141.
- [53] Kasper, M.-A.; Glanz, M.; Oder, A.; Schmieder, P.; von Kries, J. P.; Hackenberger, C. P. R. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 6322.
- [54] Kasper, M. A.; Stengl, A.; Ochrop, P.; Gerlach, M.; Stoschek, T.; Schumacher, D.; Helma, J.; Penkert, M.; Krause, E.; Leonhardt, H.; Hackenberger, C. P. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 11631.
- [55] Stieger, C. E.; Franz, L.; Korlin, F.; Hackenberger, C. P. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 1.
- [56] Abbas, A.; Xing, B.; Loh, T.-P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 7491.
- [57] (a) Peng, Z.; Zhang, Z.; Tu, Y.; Zeng, X.; Zhao, J. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5688.
(b) Peng, Z.; Zhang, Z.; Zeng, X.; Tu, Y.; Zhao, J. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 4489.
- [58] Wang, C.; Zhao, Z.; Ghadir, R.; Li, Y.; Zhao, Y.; Metanis, N.; Zhao, J. *ChemRxiv* **2021**, doi: 10.26434/chemrxiv-2021-9gxpp.
- [59] (a) Ashenhurst, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 540.
(b) Yang, Y.; Lan, J.; You, J. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8787.
- [60] (a) Simmons, R. L.; Yu, R. T.; Myers, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15870.
(b) Jbara, M.; Maity, S. K.; Brik, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 10644.
(c) Bai, Z.; Cai, C.; Sheng, W.; Ren, Y.; Wang, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 14686.
(d) Zhang, X.; Lu, G.; Sun, M.; Mahankali, M.; Ma, Y.; Zhang, M.; Hua, W.; Hu, Y.; Wang, Q.; Chen, J.; He, G.; Qi, X.; Shen, W.; Liu, P.; Chen, G. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 540.
- [61] Kundu, R.; Ball, Z. T. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4166.

- [62] Vinogradova, E. V.; Zhang, C.; Spokoyny, A. M.; Pentelute, B. L.; Buchwald, S. L. *Nature* **2015**, 526, 687.
- [63] Rojas, A. J.; Zhang, C.; Vinogradova, E. V.; Buchwald, N. H.; Reilly, J.; Pentelute, B. L.; Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 4257.
- [64] Rojas, A. J.; Pentelute, B. L.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2017**, 19, 4263.
- [65] Jbara, M.; Pomplun, S.; Schissel, C. K.; Hawken, S. W.; Boija, A.; Klein, I.; Rodriguez, J.; Buchwald, S. L.; Pentelute, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 11788.
- [66] Messina, M. S.; Stauber, J. M.; Waddington, M. A.; Rheingold, A. L.; Maynard, H. D.; Spokoyny, A. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 7065.
- [67] Kulkarni, S. S.; Sayers, J.; Premdjee, B.; Payne, R. J. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, 2, 0122.
- [68] Li, F.; Allahverdi, A.; Yang, R.; Lua, G. B. J.; Zhang, X.; Cao, Y.; Korolev, N.; Nordenskiöld, L.; Liu, C.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 9611.
- [69] Arumugam, S.; Guo, J.; Mbua, N. E.; Friscourt, F.; Lin, N.; Nekongo, E.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1591.
- [70] (a) Hu, K.; Geng, H.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Xie, M.; Sun, C.; Li, W.; Lin, H.; Jiang, F.; Wang, T.; Wu, Y.-D.; Li, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 8013.
(b) Tian, Y.; Li, J.; Zhao, H.; Zeng, X.; Wang, D.; Liu, Q.; Niu, X.; Huang, X.; Xu, N.; Li, Z. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 3325.
- [71] Zhao, G.; Kaur, S.; Wang, T. *Org. Lett.* **2017**, 19, 3291.
- [72] Vara, B. A.; Li, X.; Berritt, S.; Walters, C. R.; Petersson, E. J.; Molander, G. A. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 336.
- [73] Beard, H. A.; Hauser, J. R.; Walko, M.; George, R. M.; Wilson, A. J.; Bon, R. S. *Commun. Chem.* **2019**, 2, 133.
- [74] Bulaj, G. *Biotechnol. Adv.* **2005**, 23, 87.
- [75] (a) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 730.
(b) van Kasteren, S. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, 40, 929.
(c) Bernardes, G. J. L.; Casi, G.; Trissel, S.; Hartmann, I.; Schwager, K.; Scheuermann, J.; Neri, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 941.
(d) List, T.; Casi, G.; Neri, D. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 2641.
- [76] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, 266, 776.
- [77] Faustino, H.; Silva, M. J. S. A.; Veiros, L. F.; Bernardes, G. J. L.; Gois, P. M. P. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 6280.
- [78] Zheng, X.; Li, Z.; Gao, W.; Meng, X.; Li, X.; Luk, L. Y. P.; Zhao, Y.; Tsai, Y.-H.; Wu, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 5097.
- [79] Wu, Y.; Li, C.; Fan, S.; Zhao, Y.; Wu, C. *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32, 2065.
- [80] King, T. A.; Mandrup Kandemir, J.; Walsh, S. J.; Spring, D. R., *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 39.
- [81] Zhao, Z.; Shimon, D.; Metanis, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 12817.
- [82] Verhoog, S.; Kee, C. W.; Wang, Y.; Khotavivattana, T.; Wilson, T. C.; Kersemans, V.; Smart, S.; Tredwell, M.; Davis, B. G.; Gouverneur, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 1572.
- [83] Deng, J.-R.; Chung, S.-F.; Leung, A. S.-L.; Yip, W.-M.; Yang, B.; Choi, M.-C.; Cui, J.-F.; Kung, K. K.-Y.; Zhang, Z.; Lo, K.-W.; Leung, Y.-C.; Wong, M.-K. *Commun. Chem.* **2019**, 2, 93.
- [84] Wan, L.-Q.; Zhang, X.; Zou, Y.; Shi, R.; Cao, J.-G.; Xu, S.-Y.; Deng, L.-F.; Zhou, L.; Gong, Y.; Shu, X.; Lee, G. Y.; Ren, H.; Dai, L.; Qi, S.; Houk, K. N.; Niu, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 11919.
- [85] Toda, N.; Asano, S.; Barbas III, C. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 12592.
- [86] Boutoureira, O.; Bernardes, G. J. L.; Fernández-González, M.; Anthony, D. C.; Davis, B. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 1432.

(Zhao, C.)