高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
综合评述

连接-脱硫策略在蛋白质化学合成中的发展与应用

许　玲[1#]，尹盼盼[1#]，鲁显福[1]，李宜明[2]
（1. 安徽医科大学第一附属医院麻醉科，合肥 230022；
2. 合肥工业大学食品与生物工程学院农产品生物化工教育部工程中心，合肥 230009）

摘要　蛋白质化学合成是获取特定序列与结构蛋白质分子的关键技术，为研究蛋白质的结构与功能提供了物质基础. 传统的固相多肽合成受限于分步氨基酸偶合和脱保护反应效率，难以一次性合成分子量较大的蛋白质. 自然化学连接和酰肼连接技术作为无保护肽片段间连接的策略，具有高效选择性，极大地推动了蛋白质化学合成的发展. 然而，这些连接策略需依托蛋白质中丰度较低的半胱氨酸，难以适用于无半胱氨酸或者半胱氨酸不合适作为连接位点的蛋白质的合成. 连接-脱硫策略的提出首次将连接位点拓展至丙氨酸，并促进了硫代氨基酸的发展，使得蛋白化学合成不再受限于连接位点的选择. 在此基础上，自由基脱硫、光化学脱硫、P-B脱硫和铁催化脱硫等新兴脱硫技术的进步为蛋白质化学合成提供了多样化的选择，拓展了其应用范围. 连接-脱硫的化学方法不断地演进创新，丰富了蛋白质化学合成方法库，为蛋白质工程与化学生物学领域的深入研究提供了重要支持. 本综合评述以时间线的形式，全面回顾了连接-脱硫化学方法在蛋白质化学合成中的发展历程. 从早期基于半胱氨酸位点的自然化学连接和酰肼连接技术，到连接-脱硫策略的开创性发展，再到硫代氨基酸和多样化脱硫策略的探索，这些技术不仅丰富了多肽合成的策略，也展示了它们在合成蛋白质中的广阔应用前景和发展潜力. 本文旨在为蛋白质化学合成领域的科研工作者提供深刻的见解和有价值的信息，激发该领域的进一步探索与创新.

关键词　自然化学连接；蛋白酰肼连接；脱硫；蛋白质化学合成；硫代氨基酸
中图分类号　O621；Q512　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20240196

Development and Applications of Ligation-Desulfurization Strategy in Protein Chemical Synthesis

XU Ling[1#], YIN Panpan[1#], LU Xianfu[1*], LI Yiming[2*]
(*1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022, *China*;
2. School of Food and Biological Engineering, Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, *China*)

Abstract　Protein chemical synthesis plays a crucial role in preparing protein with specific sequences and structures. Traditional solid-phase peptide synthesis encounters limitations due to the efficiency of stepwise amino acid coupling and deprotection reactions, posing challenges for synthesizing longer proteins in a single synthesis.

收稿日期：2024-04-17. 网络首发日期：2024-05-17.
联系人简介：李宜明，男，博士，教授，主要从事多肽、蛋白质探针的化学合成及应用方面的研究.
E-mail: ymli@hfut.edu.cn, lym2007@mail.ustc.edu.cn
鲁显福，男，博士，副教授，主要从事多肽镇痛药物的开发及应用方面的研究. E-mail: luxianfu@ahmu.edu.cn
基金项目：国家自然科学基金(批准号：22207001，22277020)和安徽省自然科学基金(批准号：2208085QC74)资助.
Supported by the Natural Science Foundation of China(Nos.22207001, 22277020) and the Natural Science Foundation of Anhui Province, China (No.2208085QC74).
共同第一作者.

Native chemical ligation and peptide hydrazide ligation have significantly facilitated protein synthesis by efficiently connecting unprotected peptide fragments. However, these ligation strategies rely on the relatively low abundance of cysteine in proteins, rendering them unsuitable for synthesizing proteins lacking cysteines or with inappropriate cysteine positions for ligation. The development of protein ligation-desulfurization has surmounted this hurdle by extending ligation sites to alanine and introducing thioamino acids. This innovation liberates protein synthesis from strict ligation site requirements. Moreover, advancements like VA044-based radical desulfurization and emerging desulfurization technologies such as photochemical desulfurization, P-B desulfurization, and iron-catalyzed desulfurization provide diverse options for protein chemical synthesis and expand its application scope. Overall, the chemical methods of protein ligation-desulfurization have undergone continuous evolution and innovation. This not only enriches synthetic methodology but also empowers in-depth investigations in protein engineering and chemical biology. This review provides a comprehensive overview of the development of ligation-desulfurization chemistry approaches in protein chemical synthesis in a timeline format. From the early native chemical ligation and peptide hydrazide ligation based on cysteine sites, to the breakthrough development of ligation-desulfurization strategies, to the exploration of thioamino acids and diversified desulfurization strategies, these techniques have not only enriched the strategies for peptide synthesis, but also demonstrated their broad application and development potential in protein synthesis. We expect that this review will provide insightful and valuable information for researchers in the field of protein chemical synthesis and stimulate further exploration and innovation in this field.

Keywords Native chemical ligation; Peptide hydrazide ligation; Desulfurization; Protein chemical synthesis; Thioamino acid

蛋白质化学合成凭借对原子层面的精细操控，能够获取生物技术手段难以获得的蛋白质样品，如翻译后修饰蛋白、化学修饰蛋白、蛋白质药物和诊断工具及镜像蛋白等，为深入探索蛋白质的结构和生物学功能以及相关药物的研发提供了重要的物质基础[1,2]. 蛋白质化学合成的历史可以追溯到1901年，Fischer等[3]实现了无保护二肽的合成，自此多肽合成研究取得了蓬勃发展[4~6]. 特别是1963年Merrifield提出的固相多肽合成(SPPS)技术，使得多肽合成步骤更加标准化，极大地推动了长肽链的合成[7~9]. 然而，受限于每步氨基酸偶合和脱保护反应不断积累的各种副反应，固相多肽合成至今仍难以在保障正确产物结构与纯度的前提下一次性获取全长大于50个氨基酸的蛋白[10].

1994年，Kent等[11]发展了自然化学连接(NCL)策略. 该策略通过将一段C端为硫酯的多肽与另一段N端为半胱氨酸的多肽进行连接，实现了可保障正确产物结构与纯度的更长链多肽合成. 然而，此方法受限于多肽硫酯固有的化学活性，其反应前体难以制备，也难以实现多片段收敛合成. 2011年，Liu等[12]发展了基于酰肼原位氧化形成硫酯再进行自然化学连接的多肽酰肼连接策略. 这是一种“氧化”合成蛋白质的新途径，实现了只依赖蛋白亲核试剂的人工蛋白合成，为合成各种结构或修饰的天然乃至反手性镜像蛋白质提供了有力手段[12~14]. 尽管如此，半胱氨酸在自然界蛋白质中的低自然丰度(约为1.7%)仍限制了连接技术的应用[15]. 为克服位点的限制，研究人员开发了多种多肽连接方法，包括辅基辅助连接[16~18]、丝氨酸/苏氨酸连接(STL)[19~21]、KAHA连接[22~24]以及酶促连接[25,26]等，特别是Dawson等[27]于2001年提出的连接-脱硫策略，即连接完成后通过脱硫去除半胱氨酸上的巯基，从而实现丙氨酸位点的多肽合成. 随后，这一策略进一步被扩展至其它天然氨基酸位点，即通过制备多种硫代氨基酸进行多肽连接，脱硫后实现天然目标蛋白的合成[28].

本综合评述全面回顾了连接-脱硫化学方法在蛋白质化学合成中的发展历程. 起初，基于半胱氨酸位点的自然化学连接和多肽酰肼连接技术为多肽合成提供了可靠的工具. 随后，连接-脱硫策略的提出将连接位点从半胱氨酸扩展至丙氨酸，拓宽了多肽连接的适用范围. 在此基础上，偶氮二异丁咪唑啉盐酸盐(VA-044)自由基脱硫方法的发展显著提升了连接-脱硫策略的实用性. 硫代氨基酸的发展则进一步扩大了连接位点的选择，使连接-脱硫策略的应用范围更加广泛. 近期，一系列新兴脱硫策略如光化学脱硫、P-B脱硫和铁催化脱硫相继涌现，为蛋白质化学合成提供了更多的选择，丰富了脱硫技术的工具箱.

1 基于半胱氨酸位点的多肽连接

自然化学连接是一种利用未保护的多肽片段进行连接的合成策略[11]，涉及一条C端带有硫酯的多肽(肽1)和一条N端为半胱氨酸的多肽(肽2)．反应过程中，N端半胱氨酸的侧链巯基作为亲核试剂进攻C端硫酯的酰基碳形成一个五元环过渡态，然后通过分子内S—N酰基迁移形成天然的酰胺键[图1(A)]．自然化学连接反应的特点是操作条件温和及选择性高，且对多肽链的长度无明确限制．Kent等[11]首次使用该连接方法合成了人白细胞介素8(IL-8)．此后，其应用不断扩展，已合成出多种翻译后修饰蛋白[29~39]、环肽[40~44]和镜像蛋白[45~48]等．在此基础上，Muir等[49]发展了表达蛋白连接(EPL)技术，用于将生物重组表达的蛋白硫酯或半胱氨酸蛋白与化学合成的多肽进行连接，从而快速获取较大的目标蛋白[50~56]．尽管自然化学连接技术具有广泛的应用前景，但其存在一个技术难点，即难以通过固相合成方法制备肽硫酯．为克服这一难题，研究人员开发了多种方法，以制备与9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)-SPPS反应条件兼容的肽硫酯等价物或替代物．2011年，Liu等[12]发展了多肽酰肼连接法，对蛋白质化学合成产生了重要影响[图1(B)]．该方法将一条C端含有酰肼基团的多肽与一条N端含有半胱氨酸的多肽进行连接．反应过程中，利用亚硝酸钠激活酰肼生成高能酰叠氮中间体，然后原位硫解生成硫酯与N端半胱氨酸肽进行连接．这一策略极大地推动了蛋白质化学合成的发展，并广泛用于合成多种修饰蛋白，如糖基化人白细胞介素-6(IL-6)[57]、重症急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)刺突受体结合域[58]和促红细胞生成素[59]、磷酸化p62蛋白[60]、乙酰化Atg3[61]、多聚泛素链[62~65]以及泛素化/小泛素相关修饰物(SUMO)修饰的核小体[66~70]和N端降解子(N-degron)[71]等．此外，该方法在蛋白探针[72~74]、蛋白药物和诊断工具[75~79]、镜像蛋白[80~83]及膜蛋白[84]的合成领域也展现出广阔的应用前景．多肽酰肼连接的优势在于，酰肼和半胱氨酸的正交性质使得在多片段连接中可以顺序进行酰肼活化和连接反应，尤其适用于多片段收敛式的蛋白质化学合成，从而简化了大型蛋白的化学合成操作．此外，肽酰肼不仅可以直接通过Fmoc-SPPS制备，还可从重组表达的蛋白质中获得[85]，为蛋白质的化学合成提供了便利．可见，自然化学连接及多肽酰肼连接策略的发展和应用不仅丰富了蛋白质化学合成的方法体系，也有力地推动了合成生物学和化学生物学相关领域的发展．

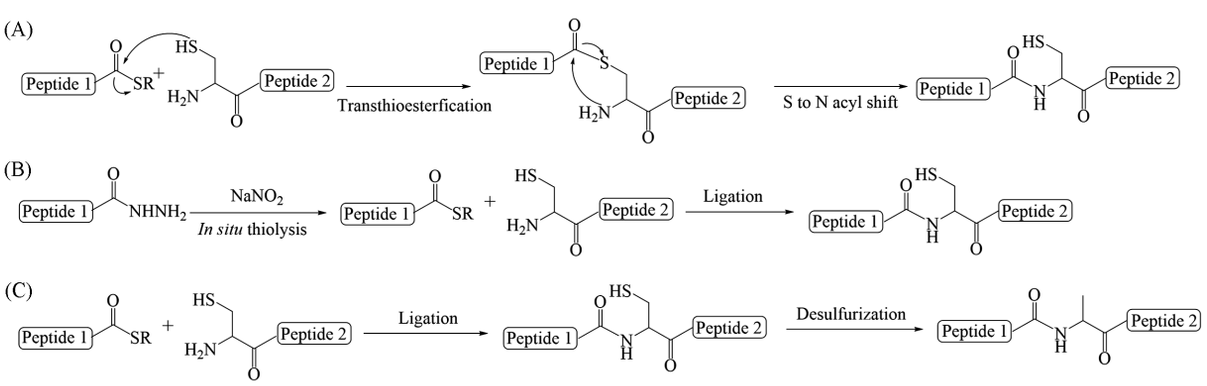


Fig. 1　Natural chemical ligation(A), peptide hydrazide ligation(B) and ligation-desulfurization strategy(C)

2 连接-脱硫策略的提出

为扩大连接位点的范围，Dawson等[27]采用半胱氨酸替代丙氨酸进行连接，随后通过脱硫去除巯基形成丙氨酸连接的多肽，开创了连接-脱硫相结合的策略[图1(C)]．首先以环肽Microcin J25作为研究对象，将两片段多肽连接后使用Pd/Al_2O_3金属催化剂进行脱硫，反应2 h即可获得目标产物，证实了连接-脱硫策略的可行性．研究还表明，Pd/C，$Pd/BaSO_4$和Raney Ni等金属催化剂均能够表现出较高的脱硫效率．为验证该方法的通用性，进一步合成了丙氨酸连接的链球菌蛋白G B1结构域(PGB1)和Barnase蛋白．然而，在延长脱硫反应时间的过程中，发现Raney Ni会逐渐导致甲硫基团的脱除，

Pd/Al_2O_3则会产生少量的色氨酸氢化副产物. 这些发现为后续进一步优化脱硫反应条件, 提高反应选择性和产率提供了参考.

3 基于VA-044的自由基脱硫方法

2007年, Danishefsky等[86]发展了一种脱硫策略, 使用水溶性的VA-044作为自由基引发剂, 结合三(2-羧乙基)膦(TCEP)和叔丁基硫醇(*t*-BuSH), 实现了无金属催化的肽链自由基脱硫反应(图2). 在该体系中, VA-044作为自由基引发剂诱导半胱氨酸的巯基转化成硫自由基B. 硫自由基B与烷基膦TCEP反应脱硫生成硫膦化合物及碳自由基D, 碳自由基D通过攫取*t*-BuSH的S—H氢原子生成还原脱硫产物E[图2(A)]. 该策略的一个显著优点是适用性广泛, 不仅能够兼容多种功能性基团, 如糖基化和磷酸化基团, 还适用于各种氨基酸, 尤其是易于发生脱硫反应的甲硫氨酸, 以及其它含有硫的基团如乙酰胺甲基保护的半胱氨酸[Cys(Acm)]、生物素、1,3-噻唑烷-4-羰基(Thz)和硫酯[图2(B)]. 该策略已被用于合成多种重要蛋白家族, 包括泛素蛋白家族[图2(C)][87~90]、α-synuclein家族[图2(D)][91~95]和组蛋白[96~101]等. 需要强调的是, 该策略显著提升了脱硫在蛋白质化学合成中的实用性, 为制备具有不同连接位点和修饰的蛋白质提供了有力工具.

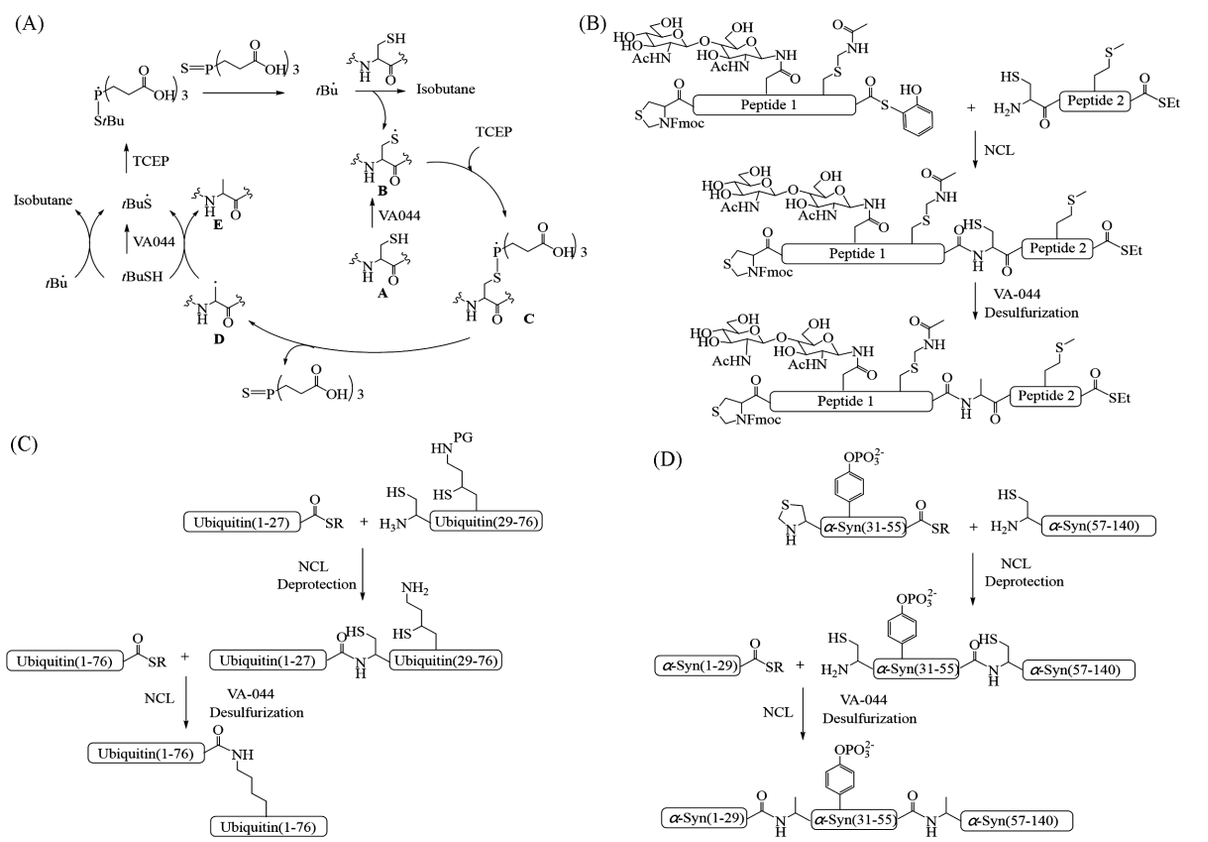


Fig. 2 VA-044-based free radical desulfurization reaction mechanism(A), VA-044-based free radical desulfurization strategy used for the synthesis of peptides containing multiple functional groups(B), diubiquitin(C) and phosphorylation-modified α-synuclein(D)

4 硫代氨基酸拓展连接-脱硫策略

连接-脱硫策略和自由基脱硫策略的提出极大地推动了硫代氨基酸的发展及其在多肽连接中的应用. 目前, 研究人员设计已合成了基于苯丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸、亮氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、天冬氨酸、精氨酸、异亮氨酸、谷氨酸和色氨酸的硫代氨基酸. 这些氨基酸衍生物被引

入到适当的肽段中充当连接体，依托后续脱硫反应实现天然蛋白质合成，从而扩大了连接-脱硫的应用范围(图3).

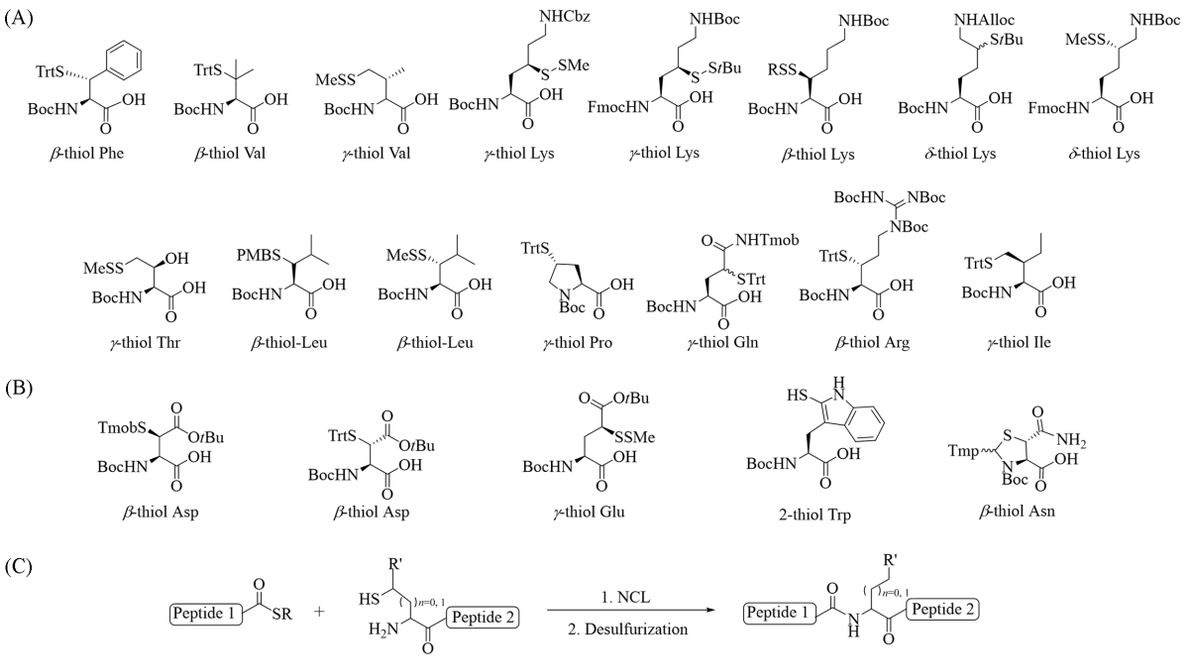


Fig. 3 Thioamino acids synthesized by nucleophilic substitution strategy(A) and electrophilic substitution strategy(B), β-/γ-/δ-thioamino acids used for NCL-desulfurization chemistry(C)

4.1 亲核取代合成硫代氨基酸拓展连接-脱硫策略

在合成硫代氨基酸的过程中，通常以通用氨基酸为合成框架，然后利用特定的巯基亲核试剂(如硫代乙酸酯)与羟基活化酯功能化的氨基酸单元(如甲磺酸酯)进行亲核取代反应合成多种硫代氨基酸，包括β-硫代苯丙氨酸、γ-硫代缬氨酸、γ-硫代赖氨酸、δ-硫代赖氨酸、β-硫代赖氨酸、γ-硫代苏氨酸、β-硫代亮氨酸、γ-硫代脯氨酸、γ-硫代谷氨酰胺、γ-硫代异亮氨酸和β-硫代精氨酸等.

4.1.1 苯丙氨酸位点的连接 2007年，Banerjee等[102]首次以苯丙氨酸为研究对象合成了β-硫代苯丙氨酸(**3**)[图4(A)]. 作者认为Phe的β位可直接官能化，且生成苄基C—S键的键能比常规的烷烃键能低，

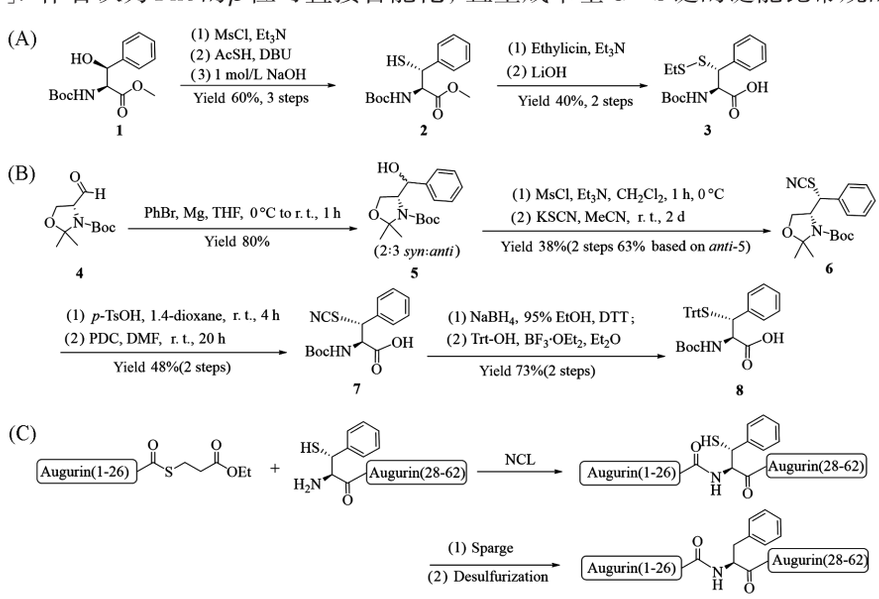


Fig. 4 Synthesis of β-thiophenylalanine 3(A) and 8(B), β-thiophenylalanine used for one-pot ligation-desulfurization to synthesize of the hormone Augurin(C)

因此在脱硫时较易脱除，与其它含硫氨基酸兼容．在合成过程中，首先按照Easton等[103]的方案制备了β-羟基取代的苯丙氨酸(**1**)．随后，通过经典的甲磺酸酯化活化、亲核取代引入巯基及保护基置换等操作生成β-硫代苯丙氨酸(**3**)．将其引入肽链中，分别与C端为甲硫氨酸和甘氨酸的多肽进行连接，均能够获得目标多肽，证实了其在连接反应中的适用性．

2015年，Payne等[104]简化合成路线，以Garner醛(**4**)为起始原料，经过加成、甲磺酸酯化、硫氰化物亲核取代、脱缩酮保护、羧酸形成、还原以及巯基保护等7步反应，合成了β-硫代苯丙氨酸(**8**)[图4(B)]．连接速率测试结果表明，尽管苯基侧链增大了空间位阻，但其连接速率仅略低于半胱氨酸．最后，利用该非天然氨基酸实现一锅式连接-脱硫，合成了长度为62个氨基酸的激素Augurin[图4(C)]．

4.1.2　缬氨酸位点的连接　鉴于缬氨酸在天然蛋白中的丰度较高，2008年，Danishefsky等[105]开展了γ-硫代缬氨酸(**16**)的合成研究(图5)．他们认为与市场上易获得的β-硫代缬氨酸(青霉胺)相比，γ-位点的巯基活性更高，更有利于连接．基于此，以Fmoc-Asp-O*t*Bu(**9**)为起始原料，通过10步化学反应合成了γ-硫代缬氨酸(**16**)，巯基的引入策略与合成β-硫代苯丙氨酸类似．随后，评估了γ-硫代缬氨酸进行连接反应的效率，并与青霉胺进行了比较．结果表明，γ-硫代缬氨酸(**16**)与C端低位阻氨基酸(如Gln和Phe)的连接可在1 h内完成，明显快于青霉胺．当C端的立体位阻增加时(如Thr)，γ-硫代缬氨酸(**16**)的连接速率虽有所下降，但仍在可接受的范围内，且保持了良好的产率，而青霉胺的反应速率则显著降低．最后，利用γ-硫代缬氨酸(**16**)参与的连接-自由基脱硫，实现了糖基化目标多肽的合成．

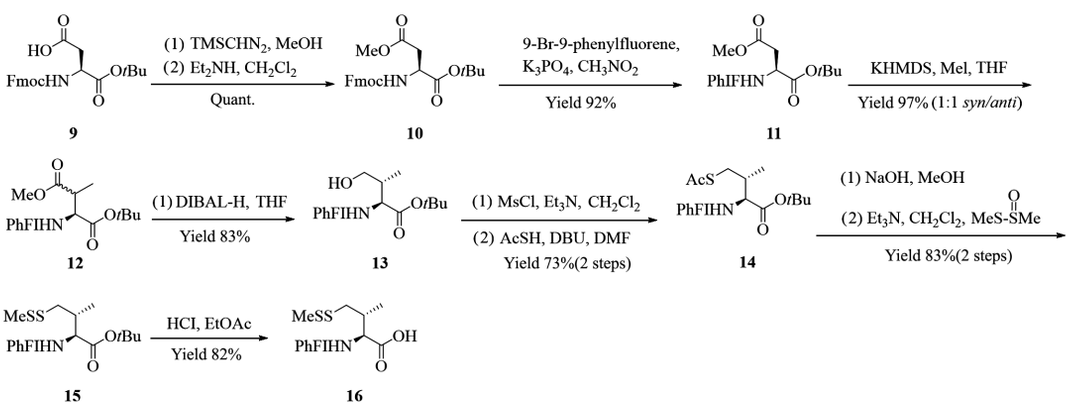


Fig. 5　Synthesis of γ-thiovaline(16)

4.1.3　赖氨酸位点的连接　鉴于在赖氨酸的γ碳上引入巯基基团可以辅助α-氨基和ε-氨基的两次连接，从而形成酰胺键和异肽键．2009年，Liu等[106]报道了γ-硫代赖氨酸(**24**)的合成[图6(A)]．该研究以Boc-Asp-O*t*Bu(**17**)为起始原料，首先参照Guichard等[107]的方法制备了4-羟基赖氨酸(**18**)．随后，通过甲磺酸酯化、叠氮化、还原、保护及亲核取代引入巯基及皂化等16步操作，最终实现了γ-硫代赖氨酸(**24**)的合成．最后，将这一氨基酸衍生物应用于肽链的α-氨基和ε-氨基的两次连接，制备了泛素化的多肽蛋白[图6(C)]．2013年，Ovaa等[108]简化了γ-硫代赖氨酸的合成路线，直接从赖氨酸出发，通过氯化反应和9-硼杂双环[3. 3. 1]壬烷(9-BBN)活化γ位点，通过8步反应完成目标产物的合成并获得克级γ-硫代赖氨酸(**30**)[图6(B)]．2017年，该课题组进一步优化了保护基团的选择，替换掉硅胶柱难以分离的9-BBN保护基，采用常规保护试剂，不仅简化了脱保护和纯化过程，还以较高的纯度和收率获得了目标产物[109]．最终，利用该化合物合成了多种链型的多聚泛素链，包括K6，K11，K27，K29，K33和K48连接的多聚泛素链以及K63连接的二泛素．

2009年，Brik等[110]设计合成δ-硫代赖氨酸(**37**)，用于多肽的异肽键连接[图7(A)]．以*L*-谷氨酸(**31**)作为起始原料，通过Martin酯化反应选择性地将侧链羧基转化为醛基(**32**)[111]．随后，经过Henry反应、醋酸酐化和消除、Michael受体加成构建巯基及保护等操作，共9步合成了δ-硫代赖氨酸(**37**)．异肽键连接测试结果表明，δ-硫代赖氨酸连接速率与半胱氨酸近似．这一现象可能归因于其侧链的灵活

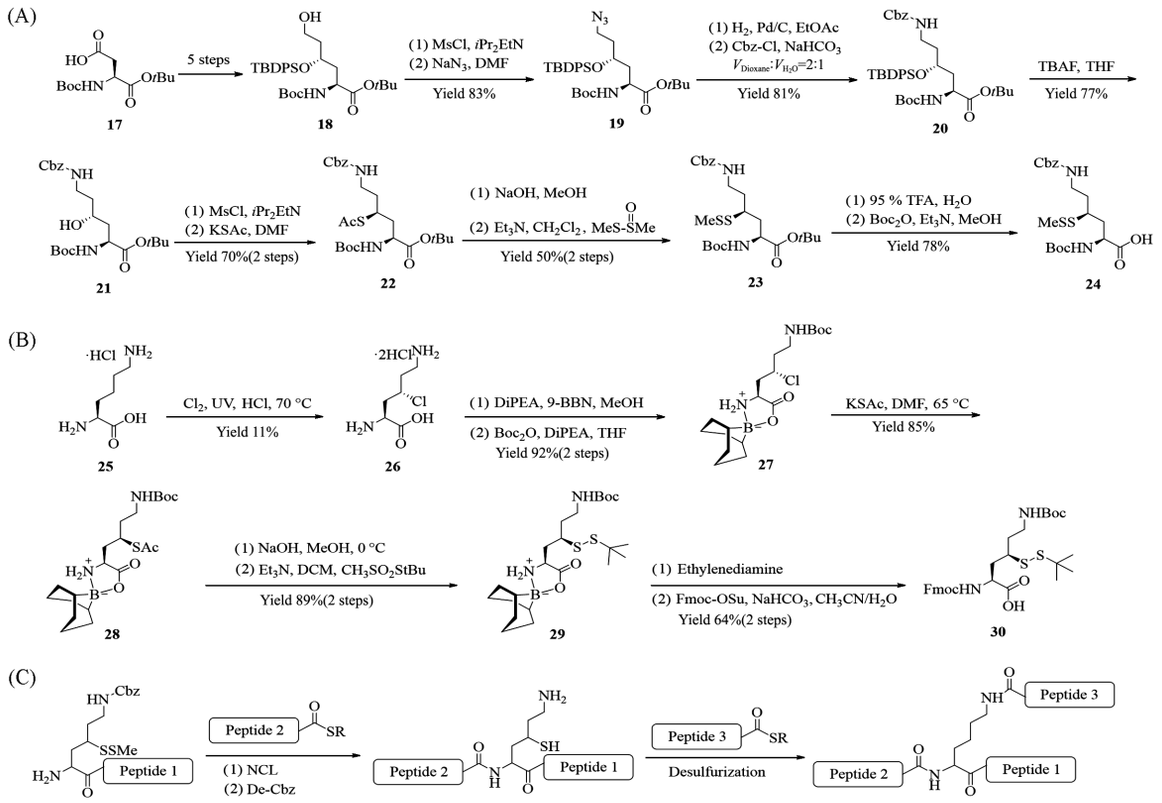


Fig. 6 Synthesis of γ-thiolysine(24, A) and 30(B), γ-thiolysine mediates the double ligation of α- and ε-amino group(C)

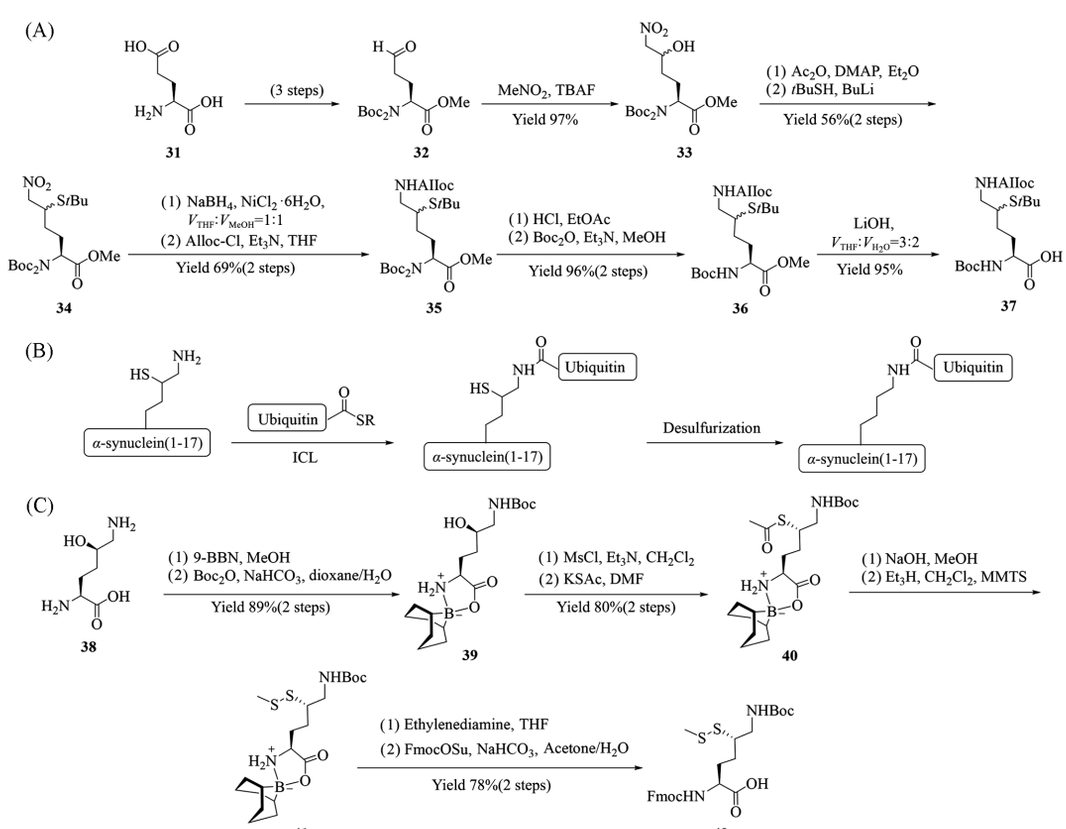


Fig. 7 Synthesis of δ-thiolysine 37(A) and 42(B), δ-thiolysine used for ICL to prepare ubiquitylated α-synuclein(1-17)(C)

性导致巯基的亲核性增强，并且巯基未直接连接到羰基从而避免了诱导效应．利用这一化合物制备了泛素化的α-synuclein(1-17)[图7(B)]．2010年，Ovaa等[112]报道了一条更直接的合成路径，从δ-羟基赖氨酸(**38**)出发，经8步反应合成了δ-硫代赖氨酸(**42**)[图7(C)]，并用于7种不同连接位点的二泛素合成．尽管该路径在操作上更简便，但由于δ-羟基赖氨酸成本较高，故在大规模合成中仍面临一定的挑战．

2019年，Dong等[113]报道了一种简便高效的β-硫代赖氨酸(**48/49**)合成方法(图8)．该方法的关键在于采用了Renata等[114]的酶催化策略，将赖氨酸(**43**)一步转化为β-羟基赖氨酸这一关键中间体，从而显著缩短合成路径．随后，通过一系列保护、活化及亲核取代等8步反应获得了目标产物．连接反应测试结果表明，当C端的氨基酸位阻较小或中等时，反应能够顺利进行．而对于大位阻氨基酸，如亮氨酸和缬氨酸，则需要提高温度或延长反应时间．最终，利用β-硫代赖氨酸制备了长度为138个氨基酸的人类细胞因子干扰素γ(IFN-γ)．

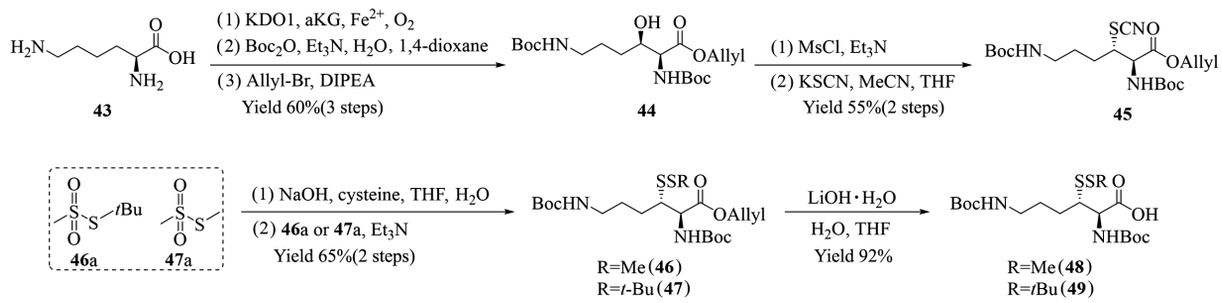


Fig. 8　Synthesis of β-thiollysine(48/49)

4.1.4　*苏氨酸位点的连接*　2010年，Danishefsky等[115]报道了γ-硫代苏氨酸(**54**)的合成(图9)．该研究以官能团保护的乙烯基甘氨酸(**50**)为起始原料，经环氧化和开环反应引入巯基，随后通过一系列保护基的转换，经7步反应实现了目标产物的合成．连接反应测试结果显示，当C端为低位阻氨基酸(如Ala，Gln和Phe)时，反应可在30 min内完成．即使是中等位阻的苏氨酸，连接反应也可在1 h内完成．随着C端氨基酸位阻的增加(如Leu，Val，Ile和Pro)，反应速度略有下降但仍在可接受范围．最后，利用该氨基酸衍生物进行连接-自由基脱硫，获得了糖基化的多肽．

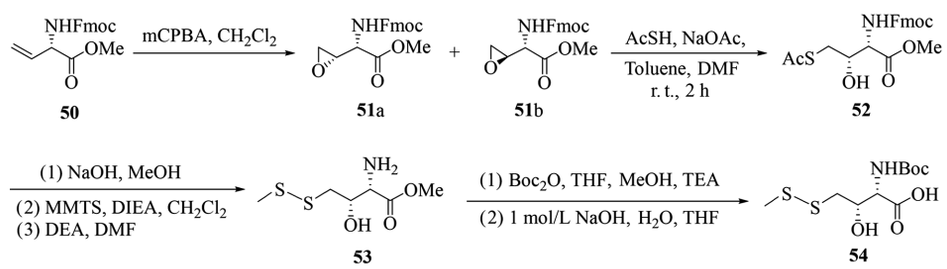


Fig. 9　Synthesis of γ-thiothreonine 54

4.1.5　*亮氨酸位点的连接*　2010年，Brik等[116]报道了β-硫代亮氨酸(**59**)的合成[图10(A)]．以β-羟基亮氨酸(**55**)为起始物，通过保护基处理和环氧化形成关键中间体，然后使用对甲氧基苯甲基硫醇(PMB-SH)引入巯基．该反应条件温和，整体收率较高．实验中测试了该氨基酸衍生物在连接反应中的效率，尽管与半胱氨酸相比连接速度稍慢但仍可与位阻较大的亮氨酸连接．最终，将其用于86个氨基酸的HIV-1转录激活因子(Tat)蛋白的全合成．

同年，Danishefsky等[117]也报道了一种高效合成β-硫代亮氨酸(**64**a)的方法[图10(B)]．该策略以β-羟基亮氨酸(**60**a)为起始原料，通过保护基处理、活化及亲核取代等步骤引入巯基，经7步反应获得了反式-β-硫代亮氨酸(**64**a)．在合成过程中，采用硫代乙酸钾有效规避了位阻较大的氨基酸侧链在强

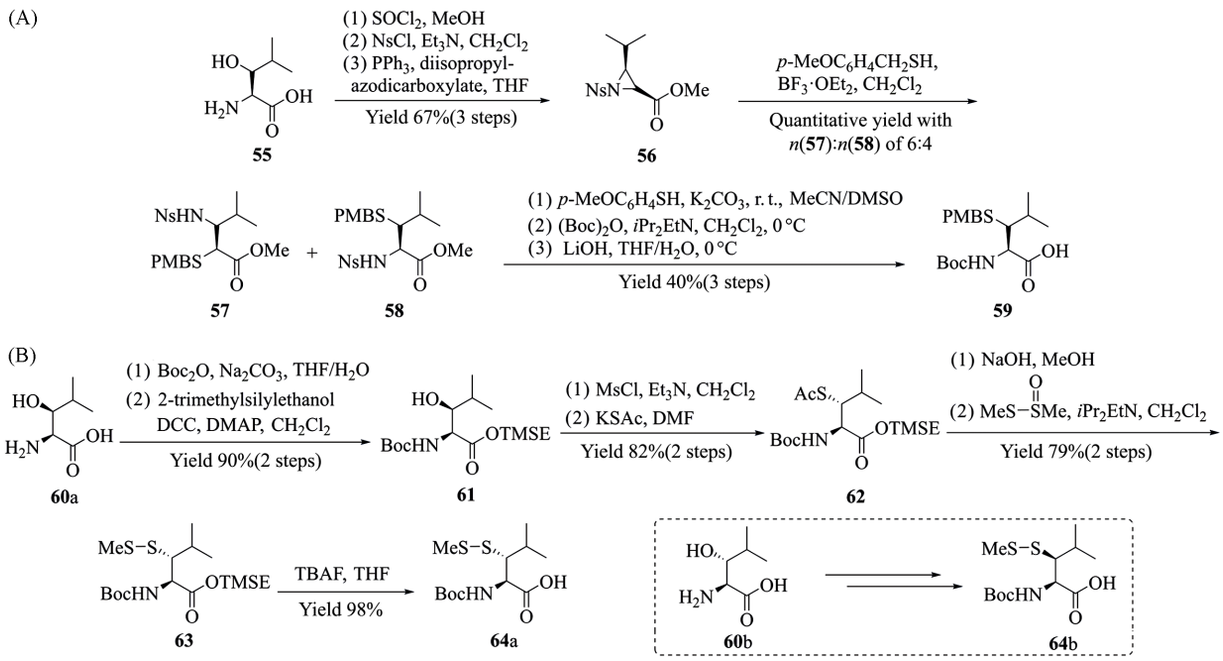


Fig. 10　Synthesis of *β*-thioleucine 59(A) and 64(B)

碱条件下发生的消除反应，确保获得单一立体异构体．采用相同步骤，还制备了顺式-*β*-硫代亮氨酸（**64**b）．将两种氨基酸衍生物进行连接反应，发现*β*-硫代亮氨酸（**64**a）的反应速率比其顺式构象的异构体**64**b更快，这可能归因于其形成的反式中间体有利于后续的酯交换过程．然而与半胱氨酸相比，*β*-硫代亮氨酸（**64**a）介导的连接反应较慢．最终，依据两者反应速率的差异，顺序进行了半胱氨酸和*β*-硫代亮氨酸的连接反应，随后通过脱硫合成了EPO（95-120）．

4.1.6　脯氨酸位点的连接　2011年，Otaka等[118]报道了*γ*-硫代脯氨酸（**69**）的合成（图11）．以市售的反式-*β*-羟基脯氨酸（**65**）为起始物，通过环氧化形成关键中间体，再经硫代乙酸钾处理引入巯基，经7步反应获得反式-*γ*-硫代脯氨酸（**69**）．此外，通过相同的操作流程合成了相应的顺式-*γ*-硫代脯氨酸（**70**）．在进行连接反应时发现，反式-*γ*-硫代脯氨酸（**69**）参与的连接反应速率比半胱氨酸慢，但仍能获得正确连接的产物；而使用顺式-*γ*-硫代脯氨酸（**70**）则几乎无法获得正确的连接产物．最终，依据两者反应速率的差异，顺序进行了半胱氨酸以及反式-*γ*-硫代脯氨酸（**69**）连接，并经脱硫还原合成了牛胰岛素C肽．

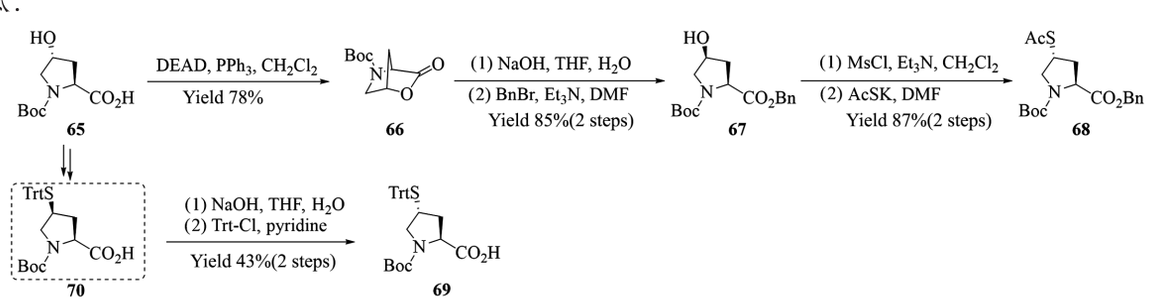


Fig. 11　Synthesis of *γ*-thioproline(69)

4.1.7　谷氨酰胺位点的合成　2012年，Brik等[119]报道了*γ*-硫代谷氨酰胺（**78**）的合成（图12）．以市售的*L*-天冬氨酸（**71**）为起始物，采用Hernández等[120]的方法，经3步反应将其侧链羧基转化为醛基（**72**）．随后，通过Passerini三组分反应、硫脲反应去除溴乙酰基团、甲磺酸酯化、硫代乙酸的亲核取代以及三苯甲基（Trt）等9个关键步骤，合成了*γ*-硫代谷氨酰胺（**78**）．研究发现，该非天然氨基酸可有效进行连接反应，但无法使用自由基脱硫．推测其原因是谷氨酰胺分子的*γ*位上形成的自由基发生了副反应．为了解决该问题，作者采用了不涉及自由基中间体的硼化镍脱硫条件，得到了目标产物．最终，利用合

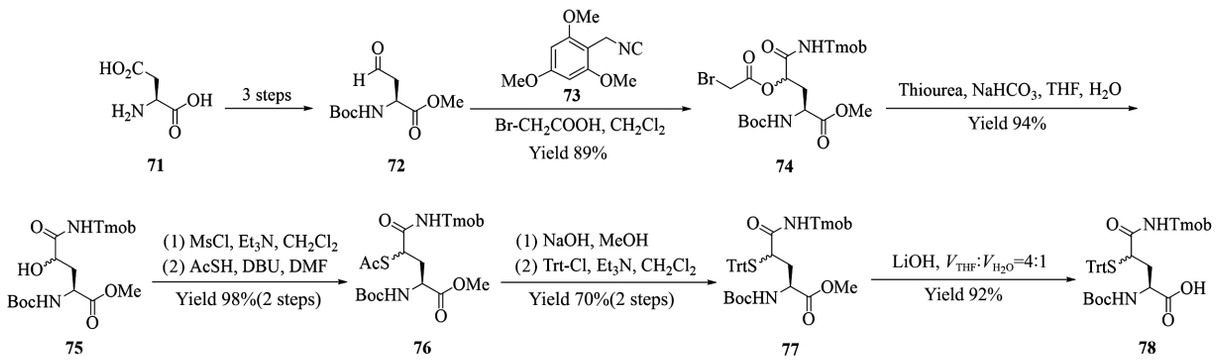


Fig. 12　Synthesis of γ-thioglutamine(78)

成的γ-硫代谷氨酰胺(**78**)实现了YAP65 WW结构域的合成，展现了该方法的高效性和可行性.

4.1.8　精氨酸位点的连接　2013年，Payne等[121]报道了β-硫代精氨酸(**88**)的合成(图13). 以市售的*R*-Garner醛(**79**)为起始物，经过加成、保护、活化和亲核取代等步骤，共计13步反应合成了β-硫代精氨酸(**88**). 研究发现，β-硫代精氨酸参与的连接反应速率与半胱氨酸相近，但在进行自由基脱硫时速率较慢. 这可能是由于精氨酸侧链的胍基能够捕获部分自由基而降低了反应速率. 最终，利用β-硫代精氨酸(**88**)与C端硫酯不同的两条多肽进行一锅式三组分反应，合成了分子量为7000的MUC1 VNTR糖肽.

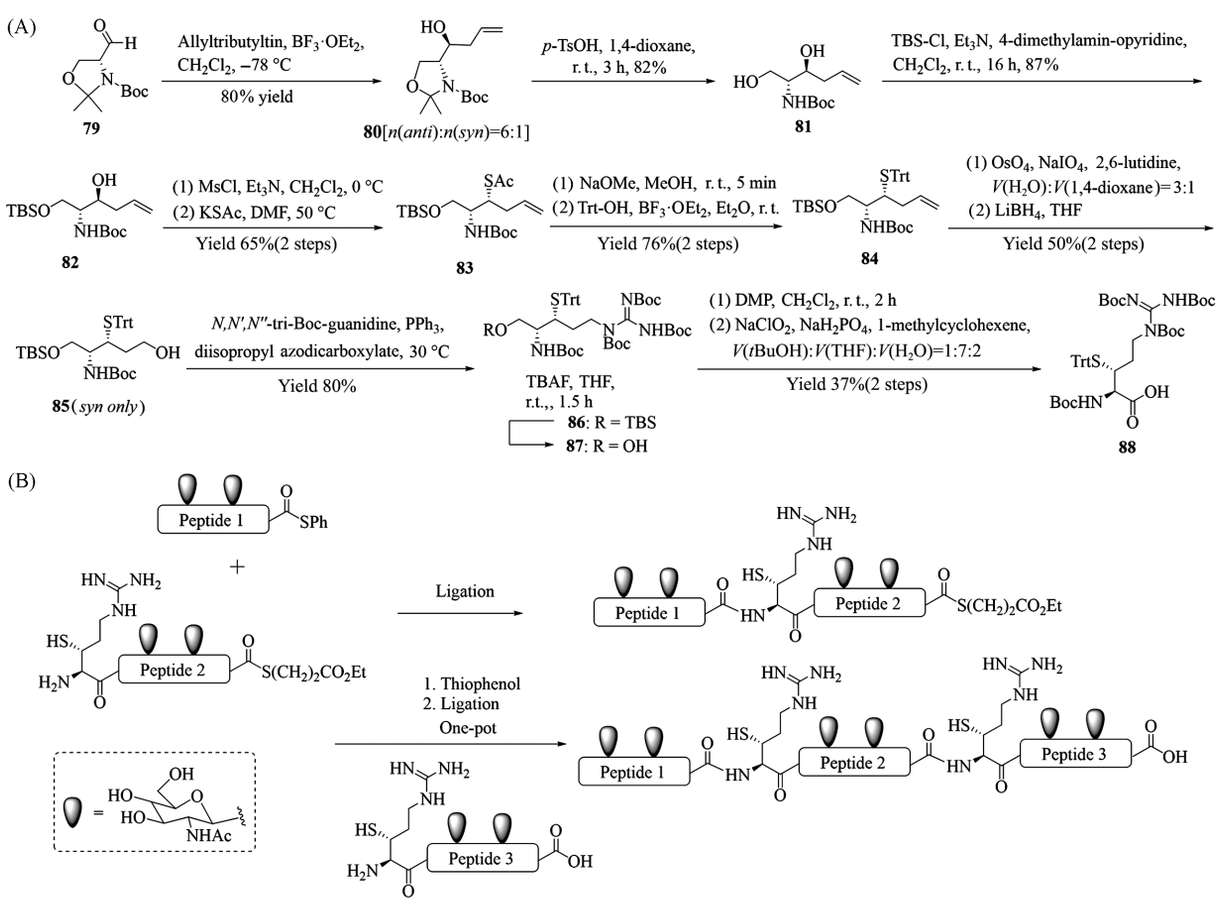


Fig. 13　Synthesis of β-thioarginine(88, A), synthesis of MUC1 VNTR glycopeptides through a kinetically controlled ligation-desulfurization sequence using β-thioarginine(B)

4.1.9　异亮氨酸位点的连接　2015年，Liu等[122]报道了一种原创性的γ-硫代异亮氨酸(**94**)合成(图14). 该策略的创新在于使用5-甲基异噁唑-3-甲酰胺(MICA)辅助引导钯催化的定点C—H乙酰氧化

反应，直接在异亮氨酸分子的γ位引入乙酰基[123]. 随后，经过一系列保护基处理和巯基置换反应将硫原子插入到γ位，从而获得了γ-硫代异亮氨酸(**94**). 研究发现，该非天然氨基酸可有效进行连接反应，并被用于组蛋白H3C110A/K115Ac的制备. 此研究为制备具有惰性γ-CH_3基团的硫代氨基酸提供了一种新的合成途径.

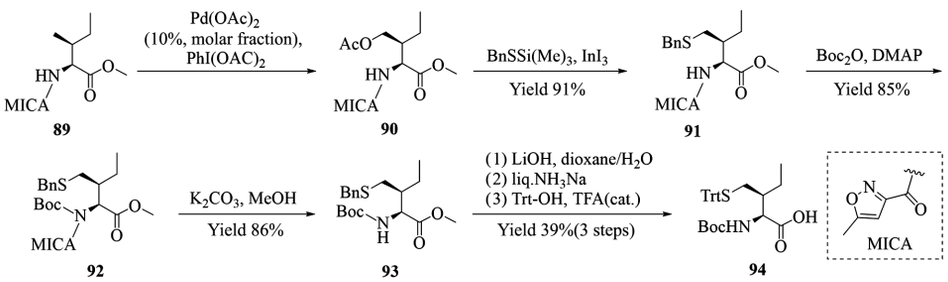


Fig. 14　Synthesis of γ-thioisoleucine(94)

4.2　亲电取代合成硫代氨基酸拓展连接-脱硫策略

除亲核取代外，亲电取代策略也被广泛应用于硫基氨基酸的合成设计中. 此方法通常以天然存在的羰基氨基酸(如天冬氨酸和谷氨酸)作为起始物，通过烯醇化作用激活其电子缺失的β位碳，进而与亲电试剂反应引入硫原子. 与亲核取代法相比，亲电取代策略更为直接和高效，通常涉及更少的步骤，有助于减少官能团和保护基团的重复转换，从而可快速获得目标产物. 具有代表性的硫代氨基酸包括β-硫代天冬氨酸、γ-硫代谷氨酸、2-巯基-色氨酸及β-硫代天冬酰胺等.

4.2.1　天冬氨酸位点的连接　2013年，Payne等[124]开发了一种三步合成β-硫代天冬氨酸(**100**)的方法[图15(A)]. 该策略的关键在于通过2,4,6-三甲基苄醇(**95**)与对甲苯硫代磺酸钾(**96**)的缩合反应，制

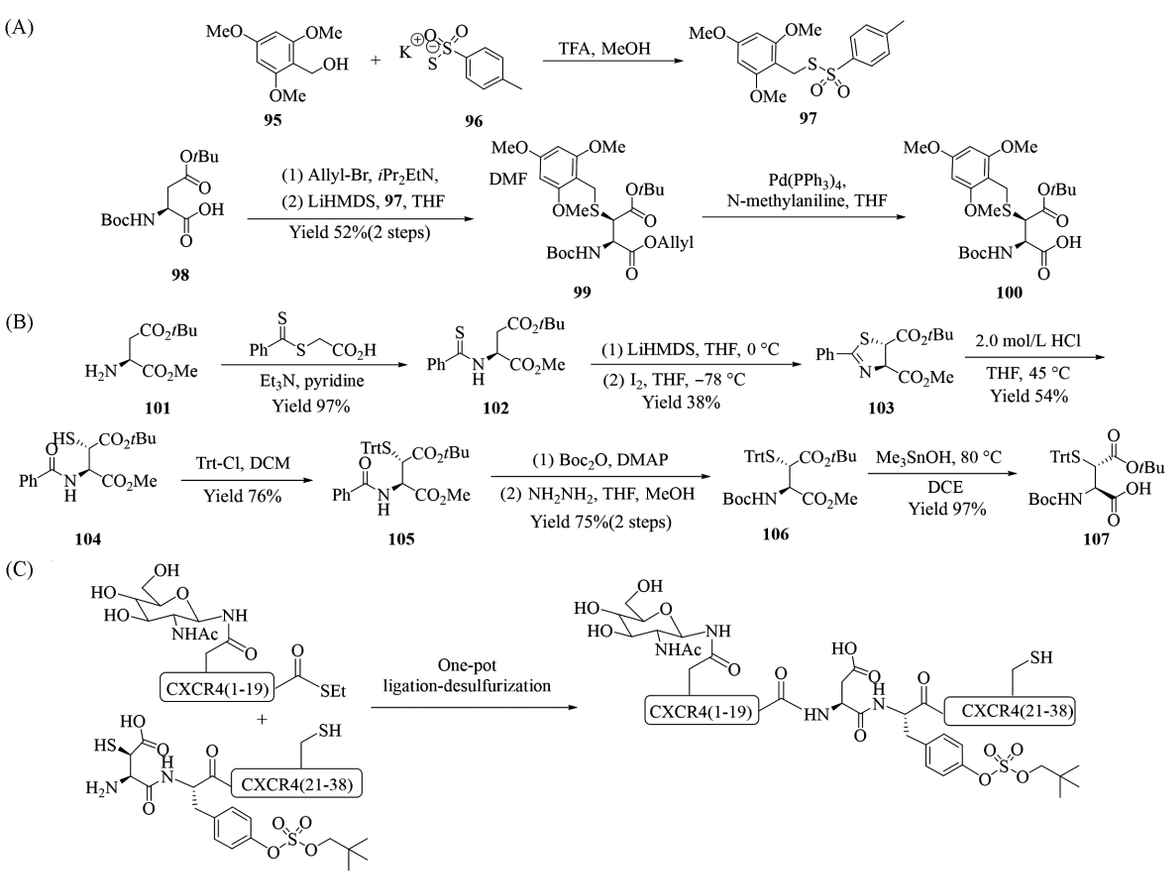


Fig. 15　Synthesis of β-thioaspartic acid 100(A) and 107(B), β-thioaspartic acid used for one-pot protein ligation- desulfurization to synthesize CXCR4 13(1−38)(C)

备了一种新型的亲电硫化试剂*S*-2,4,6-三甲氧基苄基-4-甲苯磺酸磺酯(**97**). 化合物**97**能够直接作用于天冬氨酸的*β*-位, 从而引入巯基. 之后通过脱保护处理即可得到*β*-硫代天冬氨酸(**100**). 实验结果表明, 该非天然氨基酸能够以与半胱氨酸相当的连接速率有效地进行连接反应, 且连接产物在常规自由基条件下能够顺利进行脱硫. 利用这一氨基酸衍生物, 合成了N-糖基化和Tyr硫酸化双修饰的趋化因子受体CXCR4的细胞外N端结构域[图15(C)].

同年, Tan等[125]也报道了一种高效合成*β*-硫代天冬氨酸(**107**)的策略[图15(B)]. 以市售的天冬氨酸衍生物(**101**)为起始物, 通过经典的烷基硫化和保护基处理, 仅7步反应即完成*β*-硫代天冬氨酸(**107**)的合成. 通过测试发现, 其可快速高效地进行连接反应, 速率与半胱氨酸相当, 与Payne等[107]的研究结果一致. 最后, 利用该氨基酸衍生物合成了人甘丙素样肽(hGALP).

4.2.2 谷氨酸位点的连接 2014年, Payne等[126]报道了*γ*-硫代谷氨酸(**113**)的合成(图16). 以Boc-Glu(OtBu)-OAll(**108**)为起始原料, 通过经典的烷基硫化反应将2,4-二甲氧基苯基(DMB)保护的巯基(**109**)引入到*γ*-位点, 然后利用Pd催化的烯丙基去保护后获得*γ*-硫代谷氨酸(**111**). 然而, 将*γ*-硫代谷氨酸(**111**)通过SPPS引入到多肽的N末端进行全保护脱除时, 会在酸性裂解条件下形成硫内酯, 导致N-末端的谷氨酸从多肽中解离. 为解决这个问题, 作者将DMB替换为甲基二硫化物保护基团, 得到*γ*-硫代谷氨酸(**112**). 优化后的化合物能在多肽链中稳定存在, 并成功用于一锅连接-脱硫反应, 实现了骨质疏松症药物特立帕肽的制备.

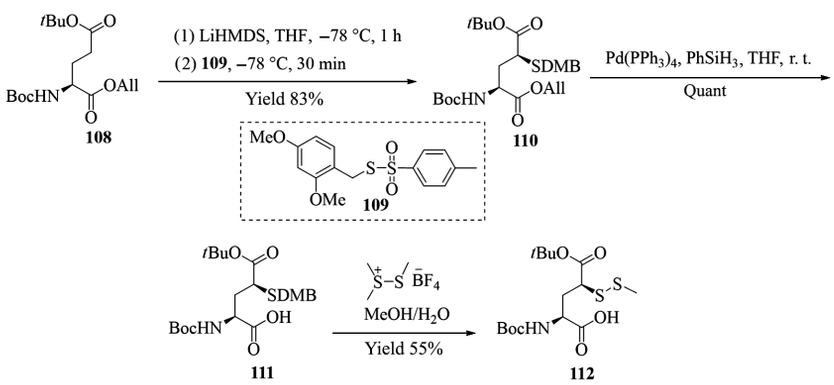


Fig. 16 Synthesis of *γ*-thioglutamate(111/112)

4.2.3 色氨酸位点的连接 2014年, Payne等[127]报道了一种快速合成2-巯基色氨酸(**116**)的策略(图17). 其关键在于采用2,4-二硝基苯基磺酰氯(DNPS—Cl)直接与色氨酸残基进行磺酰化反应, 从而在吲哚环的第2位定点引入巯基. 这一反应可直接在肽链上操作, 而无需单独制备氨基酸结构单元. 通过测试发现, 2-巯基色氨酸能够有效进行连接反应, 并且连接产物可以通过Al_2O_3/Pd催化剂脱硫. 最终, 利用2-巯基色氨酸合成了糖基化的趋化因子受体CXCR1(1-28).

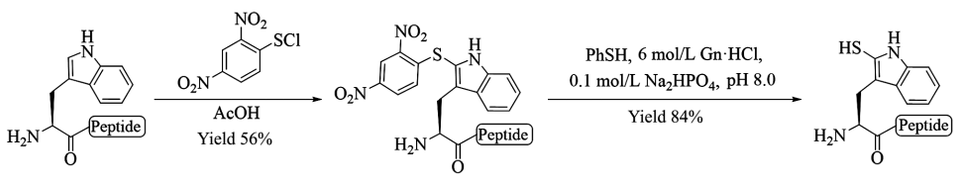


Fig. 17 Synthesis of 2-thiol tryptophan(116)

4.2.4 天冬酰胺位点的连接 2015年, Payne等[128]报道了*β*-硫代天冬酰胺(**122**a/b)的合成(图18). 该研究采用了先前取得成功的*β*-硫代天冬氨酸合成路径[124], 通过保护基和立体化学控制, 获得了*β*-硫代天冬酰胺的两种异构体*β*-硫代天冬酰胺(**122**a)和*β*-硫代天冬酰胺(**122**b). 分别将两种氨基酸衍生物用于SPPS, 结果发现*β*-硫代天冬酰胺(**122**b)的缩合效率较低, 可能是在缩合过程中形成了琥珀酰亚胺所

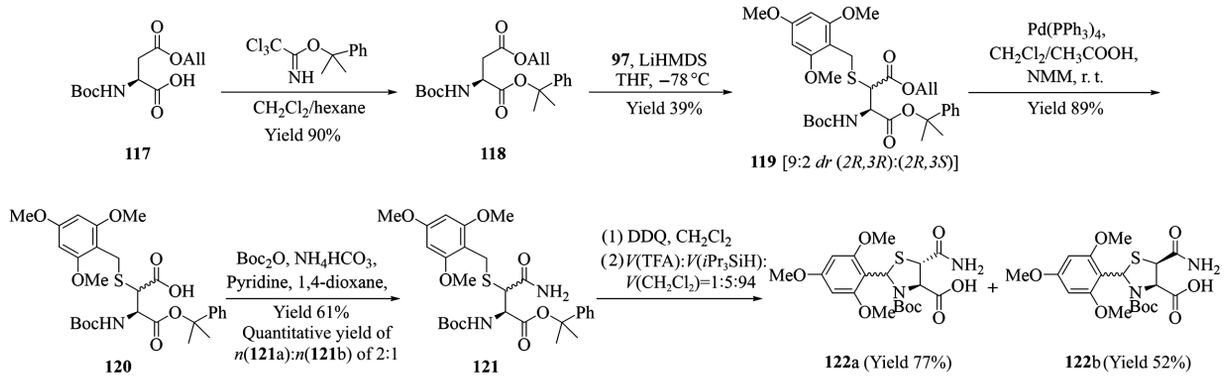


Fig. 18　Synthesis of β-thioasparagine 122a/b

致. 相对而言, β-硫代天冬酰胺(**122**a)则表现出较高的缩合效率, 还可有效、快速地进行连接, 且反应速率与半胱氨酸相当. 最后, 利用该非天然氨基酸合成了HIV融合抑制剂恩夫韦肽.

5　新兴脱硫技术

硫代氨基酸参与的连接反应进一步促进了新兴脱硫技术的发展, 包括光化学脱硫法、P-B脱硫法以及铁催化脱硫法.

5.1　光化学脱硫

2016年, Guo等[129]提出了一种基于可见光诱导的选择性肽脱硫方法(图19). 该方法利用光氧化体系, 以微量的[Ru(bpy)$_3$]Cl$_2$作为光敏催化剂, 在常温下无需加热即可高效完成脱硫反应[图19(A)]. 该过程中, Ru(II)复合物在光照下获取一个光子成激发态Ru(II)*, 然后与巯基化合物发生单电子转移生成巯基自由基和Ru(I)复合物. Ru(I)复合物随后被氧化回Ru(II)复合物, 驱动自由基链式传递. 巯基自由基阳离子脱质子形成硫自由基, 与三苯基膦三间磺酸三钠盐(TPPTS)发生作用生成亲核磷硫自由基, 随即C—S键断裂生成的烷基自由基从硫醇中攫取氢原子生成脱硫产物[图19(B)]. 该方法的最大优势在于其不需要使用高浓度的化学还原剂, 从而避免了相关的副反应, 并且可以在某些有机溶剂(如乙腈或甲醇)中进行, 提高了反应的选择性和兼容性. 研究结果表明, 该方法可以很好地耐受糖基化功能基团、甲硫氨酸、Cys(Acm)、生物素、Thz和硫酯等. 最终, 将这一策略应用于天然环肽异茶碱(J)的合成, 进一步证明了该方法在肽合成中的应用价值和潜力.

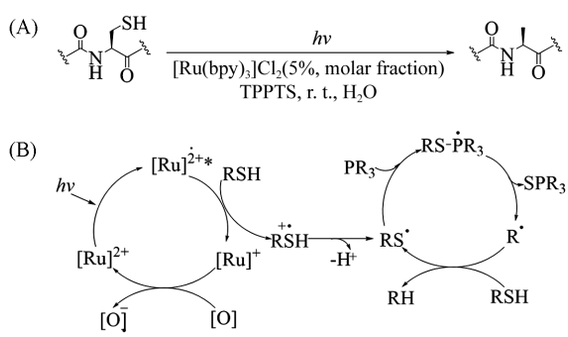


Fig. 19　Visible-light-induced transformation of cysteinyl peptide to alanyl peptide(A) and proposed mechanism of [Ru(bpy)$_3$]Cl$_2$ catalyzed desulfurization(B)

2017年, Reiser等[130]开发了一种新型的可见光激发的脱硫策略(图20). 该方法以铱配位化合物[Ir(dF(CF$_3$)ppy)$_2$(dtbbpy)]PF$_6$作为光敏催化剂, 在含有三乙氧基膦[P(OEt)$_3$]的两相体系中对半胱氨酸和谷胱甘肽进行脱硫[图20(A)]. 反应过程中, 光激发的Ir(III)催化剂与硫醇底物发生单电子转移生成硫自由基, 然后与P(OEt)$_3$反应导致C—S键断裂生成烷基自由基, 最后获得氢原子生成脱硫产物[图20(B)]. 该反应体系中, 催化剂用量可低至0.01%(摩尔分数), 并可在反应完成后高效去除. 此外, 该策略不仅适用于小分子硫醇的脱硫, 还可用于二硫键的脱硫. 然而, 在对含有半胱氨酸和甲硫氨酸的十肽进行脱硫时发现, 两种氨基酸分别被氧化为二硫化物和亚砜, 表明脱硫选择性和适用底物还有待进一步扩展.

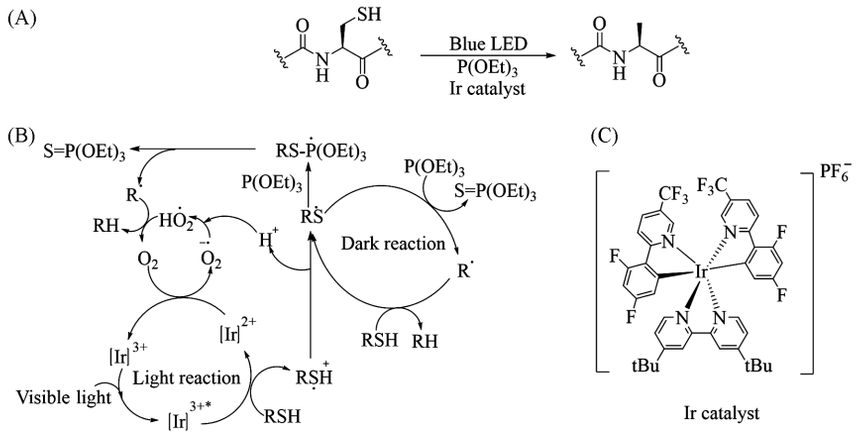


Fig. 20 Visible-light-induced transformation of cysteinyl peptide to alanyl peptide(A) and proposed mechanism of [Ir(dF(CF$_3$)ppy)$_2$(dtbbpy)]PF$_6$ catalyzed desulfurization(B) and structure of [Ir(dF(CF$_3$)ppy)$_2$(dtbbpy)]PF$_6$(C)

2021年，Sun等[131]报道了一种无金属、可见光激发的脱硫方法(图21). 采用商业上可获得 二叔丁基过氧化物(DTBP)和P(OEt)$_3$在可见光照射下对含硫底物进行脱硫，达到了96%的产率. 研究结果表明，该体系具有广泛的底物适用性，能够处理带有各种硫醚官能团的底物和含磷酸化氨基酸残基的肽链，在水溶液和多种有机溶剂中均表现优异. 目前，该方法主要应用于小分子化合物和短肽段的脱硫，尚未用于复杂蛋白的合成.

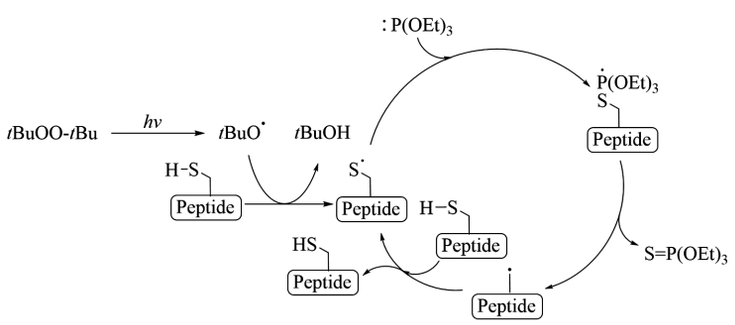


Fig. 21 Proposed mechanism of the desulfurization reaction by DTBP and P(OEt)$_3$

2023年，Stockdill等[132]报道了一种具有创新性的脱硫策略，命名为仅含磷光催化脱硫法(图22). 该方法突破了传统脱硫体系的限制，仅用市售的廉价三苯基磷(PPh$_3$)作为唯一试剂，在紫外光照射下可高效、选择性地对多肽脱硫. 该反应的独特之处在于，底物自身的巯基可以作为氢供体来源而无需额外提供. 这种单组分脱硫体系操作简便、适用性广，不仅可用于多种溶剂，还可对含有芳香基团和易氧化氨基酸的肽进行脱硫. 因此，该方法为工业生产提供了高效、经济的解决方案，为肽药物的制备提供了重要支持.

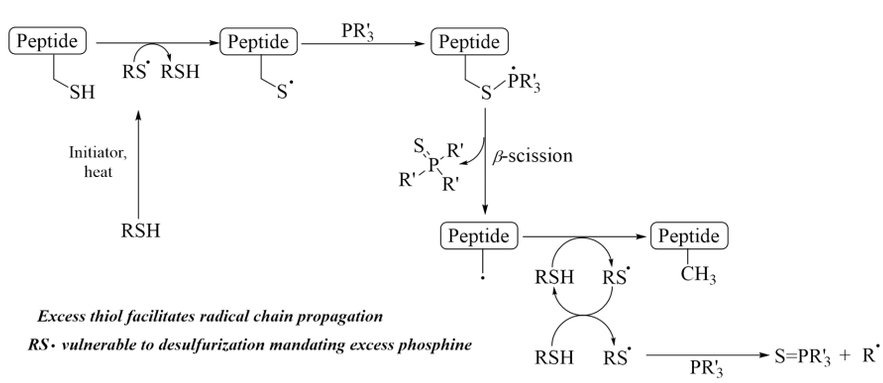


Fig. 22 Mechanism for typical radical-initiated phosphine-mediated desulfurization

2024年，Walczak等[133]发展了一种新型的四羟基二硼酸盐[$B_2(OH)_4$]自由基脱硫方法．该方法利用TCEP作为还原剂，$B_2(OH)_4$作为自由基引发剂，在室温下于4~6 h内完成了蛋白质中半胱氨酸的脱硫反应．反应机理与上述磷试剂引发自由基脱硫机理(图22)类似，不同之处在于$B_2(OH)_4$遇水和光会自发产生自由基中间体，从而引发自由基脱硫反应．值得注意的是，该方法无需特殊设备、操作简便，且对各种不同类型的蛋白质底物具有较好的适用性．此外，该反应具有较好的底物兼容性，从短肽、环肽到生物活性分子，甚至含有6~8个半胱氨酸残基的蛋白质，范围广泛．最后，该方法被应用于一锅连接-脱硫合成泛素，展示了其在化学合成领域的广泛应用前景．

5.2 P-B脱硫

Li等[134,135]基于脱硫策略报道了一系列开创性的工作，并成功应用于蛋白质的化学合成．2017年，Li等[134]首次提出了一种利用TCEP和硼氢化钠($NaBH_4$)/三乙基硼氢化锂($LiBEt_3H$)的P-B脱硫策略，可在温和的水溶液中对肽链上的巯基进行脱除[图23(A)]．反应过程中，磷试剂与硼氢化试剂进行配位

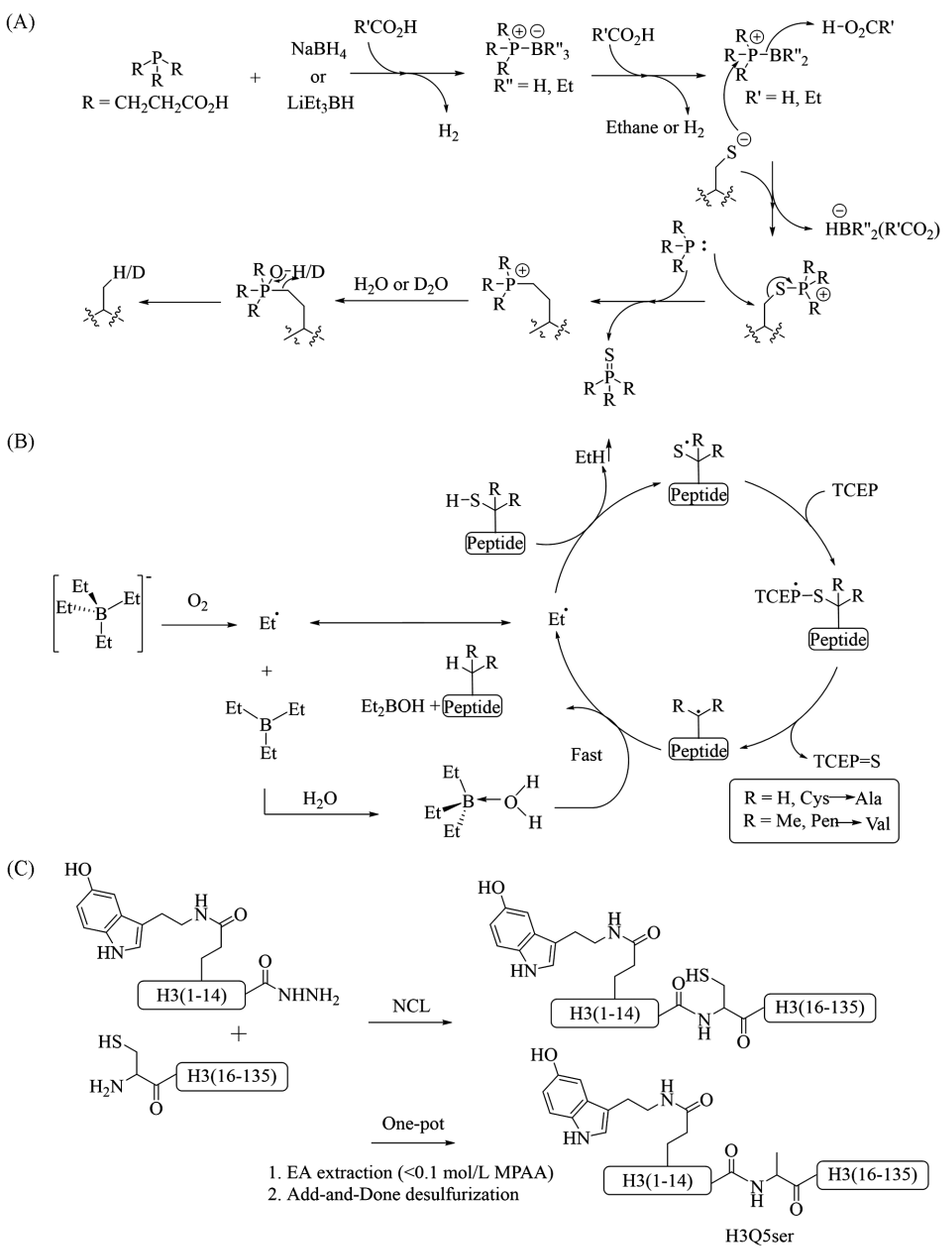


Fig. 23 Proposed mechanism of $NaBH_4$/$LiBEt_3H$-mediated desulfurization(A) and $NaBEt_4$-mediated desulfurization(B) and semisynthesis of H3Q5ser through one-pot EPL-ADD(C)

形成磷硼化合物，随后通过质子解离形成带正电的中间体．中间体与半胱氨酸残基上的硫离子发生亲核加成，形成磷硫复合物．之后，磷化合物攻击该中间体导致C—S键的β键断裂形成磷酸盐，最终通过水解生成脱硫化合物．该方法可兼容Cys(Acm)，Thz以及甲硫基团等多种保护基团和磷酸化和巴豆酰化等修饰．最后，利用该策略合成了泛素和γ-突触核蛋白和组蛋白H2A，证实了该方法的有效性．

然而，上述脱硫反应存在时间过长、产率低和底物适配性有限等问题，制约了其应用范围．为了克服这些限制，2022年该课题组[135]报道了一种基于四乙基硼酸钠($NaBEt_4$)的多肽蛋白质脱硫方法(ADD)[图23(B)]．$NaBEt_4$可在空气条件下自发活化，生成三乙基硼和乙基自由基，乙基自由基迅速与巯基反应，在TCEP的共催化下完全切断肽链上的硫醚键．整个反应在几十秒内完成(15~30 s)，无明显副反应，适应性和产率均显著提高．该方法对复杂蛋白质、正交保护基团及多种翻译后修饰，甚至少量的对巯基苯乙酸(MPAA)均表现出良好的兼容性．此外，基于该脱硫方法，还开发了一锅连接-ADD策略，并应用于白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1)胞质结构域和组蛋白H3Q5ser的合成[图23(C)]．

5.3 铁催化脱硫

2023年，Melnyk等[136]发展了一种新型的铁催化脱硫方法(图24)．该方法只需要在$NaHCO_3$缓冲液和TCEP存在下，添加少量的3-巯基-1-丙磺酸钠(MPSNa)和微摩尔浓度的铁盐即可对肽段中半胱氨酸的巯基进行选择性脱硫．在这一方法中，半胱氨酸残基的巯基在铁(III)的催化下被氧化生成硫自由基和铁(II)，硫基自由基随后与TCEP反应生成的膦硫复合物发生均裂释放出烷基自由基，烷基自由基夺取MPSNa上的氢原子生成脱硫产物．在整个反应循环中，铁(II)经氧气氧化再生为铁(III)，使反应持续催化进行[图24(A)]．该方法被应用于一锅式连接-脱硫反应，合成了具有生物活性的多肽和蛋白质，包括抗菌肽Dermaseptin B2和泛素蛋白[图24(B)]．可见，该方法操作简单、成本低廉，为化学合成蛋白质提供了一种便捷的新途径．

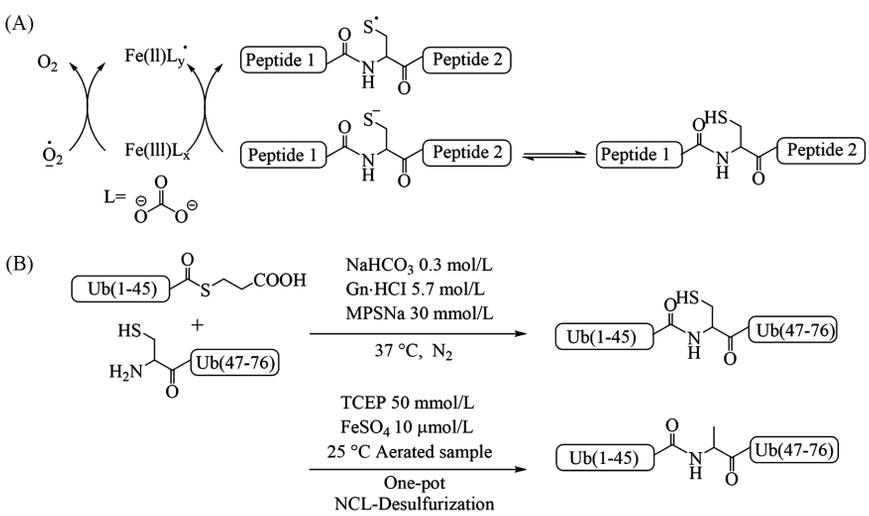


Fig. 24 Proposed mechanism of Fe catalyzed desulfurization(A), one-pot NCL-Fe catalyzed desulfurization for the preparation of ubiquitin(B)

6 总结与展望

连接-脱硫策略已经成为了化学合成蛋白质的强有力工具．基于半胱氨酸的自然化学连接和酰肼连接技术，突破了传统一次性固相多肽合成在长度上的限制，为大型蛋白的合成提供了基础．连接-脱硫策略的提出首次将连接与脱硫方法相结合，将连接位点从半胱氨酸扩展至丙氨酸，并进一步促进了硫代氨基酸的合成与发展，为蛋白质合成提供了多样化的连接位点选择．此外，脱硫技术的革新，从早期的金属催化脱硫到目前的自由基广谱脱硫，再到近年来新兴的光化学脱硫、P-B脱硫和铁催化脱硫等创新技术，极大地拓展了脱硫技术的选择范围．

尽管已经取得了显著进展，连接-脱硫方法仍面临一些挑战，特别是当蛋白质中含有原生半胱氨酸时脱硫反应缺乏化学选择性，而且该方法应用于大位阻的氨基酸连接时反应速度较慢．为解决这些问题，研究人员探索了基于硒代半胱氨酸的连接反应[137]．硒代半胱氨酸能够与肽硫酯或肽硒酯发生快速的自然化学连接反应，在脱硫过程中，硒代半胱氨酸可以在含氢原子供体[如二硫苏糖醇(DTT)和TCEP]的存在下特异性地脱硒，而不影响半胱氨酸．此外，将连接-脱硫技术与酶促蛋白连接技术[25]、疏水蛋白增溶策略[138]以及糖基辅助折叠策略[139]相结合，可以进一步拓展蛋白质合成的应用范围．酶促蛋白连接技术以其高选择性和温和的反应条件，可以精确合成具有复杂功能的较大型蛋白质．疏水蛋白增溶策略通过改善疏水性蛋白质的溶解性，有助于提高合成产率并减少聚集体的形成．而糖基辅助折叠策略则利用糖基团辅助蛋白质的正确折叠，对于合成具有复杂结构的蛋白质尤为重要．这些技术的联合使用，不仅提升了蛋白质合成的效率，还为疾病机制研究和药物开发等提供了有力工具．

随着蛋白质合成技术的不断进步和完善，期待有更多创新性方法涌现，为研究人员提供更多的工具和策略，以解决生物学和医学领域中的重大问题．未来的研究将进一步集中在开发更高效的合成方法、提高合成蛋白质的产率和纯度以及探索合成蛋白质在疾病的治疗和诊断中的应用．通过这些努力，蛋白质合成技术有望在未来为人类健康和生物技术的发展做出更大的贡献．

参　考　文　献

[1] Kent S. B. H., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*(2), 338—351
[2] Dong S. W., Zheng J. S., Li Y. M., Wang H., Chen G., Chen Y. X., Fang G. M., Guo J., He C. M., Hu H. G., Li X. C., Li Y. M., Li Z. G., Pan M., Tang S., Tian C. L., Wang P., Wu B., Wu C. L., Zhao J. F., Liu L., *Sci. China Chem.*, **2024**, *67*, 1060—1096
[3] Fischer E., Fourneau E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1901**, *34*, 2868—2877
[4] Curtius T., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1904**, *70*(1), 57—72
[5] Fischer E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1905**, *38*(1), 605
[6] Kent S., Sohma Y., Liu S. H., Bang D., Pentelute B., Mandal K., *J. Pept. Sci.*, **2012**, *18*(7), 428—436
[7] Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*(14), 2149—2154
[8] Merrifield R. B., Stewart J. M., Jernberg N., *Anal. Chem.*, **1966**, *38*(13), 1905—1914
[9] Merrifield R. B., *Science*, **1986**, *232*(4748), 341—347
[10] Hartrampf N., Saebi A., Poskus M., Gates Z. P., Callahan A. J., Cowfer A. E., Hanna S., Antilla S., Schissel C. K., Quartararo A. J., Ye X., Mijalis A. J., Simon M. D., Loas A., Liu S., Jessen C., Nielsen T. E., Pentelute B. L., *Science*, **2020**, *368*(6494), 980—987
[11] Dawson P. E., Muir T. W., Clark-Lewis I., Kent S. B. H., *Science*, **1994**, *266*(5186), 776—779
[12] Fang G. M., Li Y. M., Shen F., Huang Y. C., Li J. B., Lin Y., Cui H. K., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*(33), 7645—7649
[13] Fang G M., Wang J. X., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*(41), 10347—10350
[14] Zheng J. S., Tang S., Qi Y. K., Wang Z. P., Liu L., *Nat. Protoc.*, **2013**, *8*(12), 2483—2495
[15] Moura A., Savageau M. A., Alves R., *PloS One*, **2013**, *8*(10), e77319
[16] Loibl S. F., Harpaz Z., Seitz O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*(50), 15055—15059
[17] Offer J., *Biopolymers*, **2010**, *94*(4), 530—541
[18] Lutsky M. Y., Nepomniaschiy N., Brik A., *Chem. Commun.*, 2008, *10*, 1229—1231
[19] Li X. C., Lam H. Y., Zhang Y. F., Chan C. K., *Org. Lett.*, **2010**, *12*(8), 1724—1727
[20] Li T. L., Liu H., Li X. C., *Org. Lett.*, **2016**, 18*(22)*, 5944—5947
[21] Lee C. L., Liu H., Wong C. T., Chow H. Y., Li X. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*(33), 10477—10484
[22] Bode J. W., Fox R. M., Baucom K. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*(8), 1248—1252
[23] Pusterla I., Bode J. W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, *51*(2), 513—516
[24] Harmand T. J., Murar C. E., Bode J. W., *Nat. Protoc.*, **2016**, *11*(6), 1130—1147
[25] Schmidt M., Toplak A., Quaedflieg P. J., Nuijens T., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, 38, 1—7
[26] Han D. Y., Ren Y. X., Yang Z. Y, Huang H., Zheng J. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(10), 20230188(韩东阳, 任宇祥, 杨子毅, 黄赫, 郑基深. 高等学校化学学报, **2023**, *44*(10), 20230188)
[27] Yan L. Z., Dawson P. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*(4), 526—533
[28] Rohde H., Seitz O., *Biopolymers*, **2010**, *94*(4), 551—559
[29] Deng Z. H., Ai H. S., Sun M. S., Tong Z. B., Du Y. X., Qu Q., Zhang L. Y., Xu Z. Y., Tao S. X., Shi Q., Li J. B., Pan M., Liu L., *Mol. Cell.*, **2023**, *83*(17), 3080—3094
[30] Shin Y., Winans K. A., Backes B. J., Kent S. B. H., Ellman J. A., Bertozzi C. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*(50), 11684—11689
[31] Marcaurelle L. A., Mizoue L. S., Wilken J., Oldham L., Kent S. B. H., Handel T. M., Bertozzi C. R., *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*(5),

1129—1132
[32] Mezzato S., Schaffrath M., Unverzagt C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*(11), 1650—1654
[33] Yamamoto N., Tanabe Y., Okamoto R., Dawson P. E., Kajihara Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(2), 501—510
[34] Aussedat B., Fasching B., Johnston E., Sane N., Nagorny P., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*(7), 3532—3541
[35] Fernández-Tejada A., Vadola P. A., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*(23), 8450—8458
[36] Wilkinson B. L., Stone R. S., Capicciotti C. J., Thaysen-Andersen M., Matthews J. M., Packer N. H., Ben R. N., Payne R. J., *Angew. Chem.*, **2012**, *124*(15), 3666—3670
[37] Wang P., Dong S. W., Shieh J. H., Peguero E., Hendrickson R., Moore M. A. S., Danishefsky S. J., *Science*, **2013**, *342*(6164), 1357—1360
[38] Zhao J., Liu X. L., Liu J. L., Ye F. R., Wei B. C., Deng M. G., Li T. H., Huang P., Wang P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(4), 2615—2623
[39] Sakamoto I., Tezuka K., Fukae K., Ishii K., Taduru K., Maeda M., Ouchi M., Yoshida K., Nambu Y., Igarashi J., Hayashi N., Tsuji T., Kajihara Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*(12), 5428—5431
[40] van de Langemheen H., van Hoeke M., van Ufford H. C. Q., Kruijtzer J. A. W., Liskamp R. M. J., *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*(25), 4471—4478
[41] Lee J., Oh E. T., Lee E., Park H. J., Kim C., *New J. Chem.*, **2022**, *46*(32), 15551—15556
[42] Yim V. V., Kavianinia I., Cameron A. J., Harris P. W., Brimble M. A., *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18*(15), 2838—2844
[43] Chaudhuri D., Ganesan R., Vogelaar A., Dughbaj M. A., Beringer P. M., Camarero J. A., *J. Org. Chem.*, **2021**, *86*(21), 15242—15246
[44] Wierzbicka M., Waliczek M., Dziadecka A., Stefanowicz P., *J. Org. Chem.*, **2021**, *86*(17), 12292—12299
[45] Levinson A. M., McGee J. H., Roberts A. G., Creech G. S., Wang T., Peterson M. T., Hendrickson R. C., Verdine G. L., Danishefsky S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(22), 7632—7639
[46] Bunker R. D., Mandal K., Bashiri G., Chaston J. J., Pentelute B. L., Lott J. S., Kent S. B. H., Baker E. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*(14), 4310—4315
[47] Mandal K., Uppalapati M., Ault-Riché D., Kenney J., Lowitz J., Sidhu S. S., Kent S. B. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*(37), 14779—14784
[48] Weidmann J., Schnölzer M., Dawson P. E., Hoheisel J. D., *Cell Chem. Biol.*, **2019**, *26*(5), 645—651
[49] Muir T. W., Sondhi D., Cole P. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*(12), 6705—6710
[50] Muir T. W., *Annu. Rev. Biochem.*, **2003**, *72*(1), 249—289
[51] Bilbrough T., Piemontese E., Seitz O., *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, *51*(13), 5691—5730
[52] Shivatare S. S., Shivatare V. S., Wong C. H., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(20), 15603—15671
[53] Tashiro K., Mohapatra J., Brautigam C. A., Liszczak G., *ACS Chem. Biol.*, **2022**, *17*(4), 810—815
[54] Hanna C. C., Kriegesmann J., Dowman L. J., Becker C. F. W., Payne R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(15), e202111266
[55] Tolbert T. J., Wong C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*(23), 5421—5428
[56] Macmillan D., Bertozzi C. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*(11), 1355—1359
[57] Reif A., Siebenhaar S., Tröster A., Schmälzlein M., Lechner C., Velisetty P., Gottwald K., Pöhner C., Boos I., Schubert V., Rose-John S., Unverzagt C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*(45), 12125—12131
[58] Ye F. R., Zhao J., Xu P., Liu X. L., Yu J., Shangguan W., Liu J. Z., Luo X. S., Li C., Ying T. L., Wang J., Yu B., Wang P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(23), 12904—12910
[59] Murakami M., Kiuchi T., Nishihara M., Tezuka K., Okamoto R., Izumi M., Kajihara Y., *Sci. Adv.*, **2016**, *2(1)*, e1500678
[60] Tan X. L., Pan M., Zheng Y., Gao S., Liang L. J., Li Y. M., *Chem. Sci.*, **2017**, *8*(10), 6881—6887
[61] Li Y. T., Yi C., Chen C. C., Lan H., Pan M., Zhang S. J., Huang Y. C., Guan C. J., Li Y. M., Yu L., Liu L., *Nat. Commun.*, **2017**, *8*(1), 14846
[62] Pan M., Gao S., Zheng Y., Tan X. D., Lan H., Tan X. L., Sun D. M., Lu L. N., Wang T., Zheng Q. Y., Huang Y. C., Wang J. W., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*(23), 7429—7435
[63] Gao S., Pan M., Zheng Y., Huang Y. C., Zheng Q. Y., Sun D. M., Lu L. N., Tan X. D., Tan X. L., Lan H., Wang J. X., Wang T., Wang J. W., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*(43), 14497—14502
[64] Tang S., Liang L. J., Si Y. Y., Gao S., Wang J. X., Liang J., Mei Z. Q., Zheng J. S., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(43), 13333—13337
[65] Pan M., Zheng Q. Y., Ding S., Zhang L. J., Qu Q., Wang T., Hong D. N., Ren Y. J., Liang L. J., Chen C. L., Mei Z. Q., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*(9), 2627—2631
[66] Chu G. C., Pan M., Li J. B., Liu S. L., Zuo C., Tong Z. B., Bai J. S., Gong Q. Y., Ai H. S., Fan J., Meng X. B., Huang Y. C., Shi J., Deng H. T., Tian C. L., Li Y. M., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(8), 3654—3663
[67] Ai H. S., Guo Y., Sun D. M., Liu S. L., Qi Y. K., Guo J., Qu Q., Gong Q. Y., Zhao S. W., Li J. B., Liu L., *ChemBioChem*, **2019**, *20*(2), 221—229
[68] Ai H. S., Peng S., Li J. B., *J. Pept. Sci.*, **2022**, *28*(5), e3381

[69] Ai H. S., Chu G. C., Gong Q. Y., Tong Z. B., Deng Z. H., Liu X., Yang F., Xu Z. Y., Li J. B., Tian C. L., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(40), 18329—18337
[70] Ai H. S., Sun M. S., Liu A. J., Sun Z. X., Liu T. T., Cao L., Liang L. J., Qu Q., Li Z. C., Deng Z. H., Tong Z. B., Chu G. C., Tian X. L., Deng H. T., Zhao S. W., Li J. B., Lou Z. Y., Liu L., *Nat. Chem. Biol.*, **2022**, *18*(9), 972—980
[71] Pan M., Zheng Q. Y., Wang T., Liang L. J., Mao J. X., Zuo C., Ding R. C., Ai H. S., Xie Y., Si D., Yu Y. Y., Liu L., Zhao M. L., *Nature*, **2021**, *600*(7888), 334—338
[72] Liang L. J., Chu G. C., Qu Q., Zuo C., Mao J. X., Zheng Q. Y., Chen J. N., Meng X. B., Jing Y., Deng H. T., Li Y. M., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(31), 17171—17177
[73] Xu L., Fan J., Wang Y., Zhang Z. P., Fu Y., Li Y. M., Shi J., *Chem. Commun.*, **2019**, *55*(49), 7109—7112
[74] Zuo C., Shi W. W., Chen X. X., Glatz M., Riedl B., Flamme I., Pook E., Wang J. W., Fang G. M., Bierer D., Liu L., *Sci. China Chem.*, **2019**, *62*(10), 1371—1378
[75] Chang H. N., Liu B. Y., Qi Y. K., Zhou Y., Chen Y. P., Pan K. M., Li W. W., Zhou X. M., Ma W. W., Fu C. Y., Qi Y. M., Liu L., Gao Y. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*(40), 11760—11764
[76] Zhang L., Shen H., Gong Y. Y., Pang X. J., Yi M. Q., Guo L., Li J., Arroyo S., Lu X., Ovchinnikov S., Cheng G., Liu X. D., Jiang X., Feng S., Deng H. T., *Chem. Sci.*, **2019**, *10*(11), 3271—3280
[77] Zhao R., Shi P., Wei X. X., Xia Z. M., Shi C. W., Shi J., *Org. Lett.*, **2023**, *25*(35), 6544—6548
[78] Premdjee B., Andersen A. S., Larance M., Conde-Frieboes K. W., Payne R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*(14), 5336—5342
[79] Wang J. X., Fang G. M., He Y., Qu D. L., Yu M., Hong Z. Y., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*(7), 2194—2198
[80] Wang Z. M., Xu W. L., Liu L., Zhu T. F., *Nat. Chem.*, **2016**, *8*(7), 698—704
[81] Pech A., Achenbach J., Jahnz M., Schülzchen S., Jarosch F., Bordusa F., Klussmann S., *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*(7), 3997—4005
[82] Jiang W. J., Zhang B. C., Fan C. Y., Wang M., Wang J. X., Deng Q., Liu X. Y., Chen J., Zheng J. S., Liu L., Zhu T. F., *Cell Discov.*, **2017**, *3*(1), 1—7
[83] Zhou X. N., Zuo C., Li W. Q., Shi W. W., Zhou X. W., Wang H. F., Chen S. M., Du J. F., Chen G.Y., Zhai W. J., Zhao W. S., Wu Y. H., Qi Y. M., Liu L., Gao Y. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*(35), 15114—15118
[84] Zheng J. S., Yu M., Qi Y. K., Tang S., Shen F., Wang Z. P., Xiao L., Zhang L. H., Tian C. L., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*(9), 3695—3704
[85] Li Y. M., Li Y. T., Pan M., Kong X. Q., Huang Y. C., Hong Z. Y., Liu L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*(8), 2198—2202
[86] Wan Q., Danishefsky S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*(48), 9248—9252
[87] Yang R. L., Pasunooti K. K., Li F. P., Liu X. W., Liu C. F., *Chem. Commun.*, **2010**, *46*(38), 7199—7201
[88] Yu Y. Y., Zheng Q. Y., Erramilli S. K., Pan M., Park S., Xie Y., Li J. X., Fei J. Y., Kossiakoff A. A., Liu L., Zhao M. L., *Nat. Chem. Biol.*, **2021**, *17*(8), 896—905
[89] Bondalapati S., Mansour W., Nakasone M. A., Maity S. K., Glickman M. H., Brik A., *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*(20), 7360—7364
[90] Qu Q., Pan M., Gao S., Zheng Q. Y., Yu Y. Y., Su J. C., Li X., Hu H. G., *Adv. Sci.*, **2018**, *5*(7), 1800234
[91] Lewis Y. E., Galesic A., Levine P. M., de Leon C. A., Lamiri N., Brennan C. K., Pratt M. R., *ACS Chem. Biol.*, **2017**, *12*(4), 1020—1027
[92] Levine P. M., de Leon C. A., Galesic A., Balana A., Marotta N. P., Lewis Y. E., Pratt M. R., *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, *25*(18), 4977—4982
[93] Dikiy I., Fauvet B., Jovičić A., Mahul-Mellier A. L., Desobry C., El-Turk F., Gitler A. D., Lashuel H. A., Eliezer D., *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*(9), 2428—2437
[94] Hejjaoui M., Butterfield S., Fauvet B., Vercruysse F., Cui J., Dikiy I., Prudent M., Olschewski D., Zhang Y., Eliezer D., Lashuel H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*(11), 5196—5210
[95] Gatzemeier L. M., Meyer F., Diederichsen U., Outeiro T. F., *Chem. Eur. J.*, **2023**, *29*(33), e202300649
[96] Jing Y. H., Ding D. B., Tian G. F., Kwan K. C. J., Liu Z., Ishibashi T., Li X. D., *Nucleic Acids Res.*, **2020**, *48*(17), 9538—9549
[97] Qi Y. K., He Q. Q., Ai H. S., Guo J., Li J. B., *Chem. Commun.*, **2017**, *53*(29), 4148—4151
[98] Li J. B., He Q., Liu Y. T., Liu S. L., Tang S., Li C. M., Sun D. M., Li X. R., Zhou M., Zhu P., Bi G. Q., Zhou Z. H., Zheng J. S., Tian C. L., *ChemBioChem*, **2017**, *18*(2), 176—180
[99] Li J. B., Qi Y. K., He Q. Q., Ai H. S., Liu S. L., Wang J. X., Zheng J. S., Liu L., Tian C. L., *Cell Res.*, **2018**, *28*(2), 257—260
[100] Li J. B., Liang J., Tian C. L., *Meth. Enzymol.*, **2020**, *639*, 263—287
[101] He Q. Q., Li J. B., Qi Y. K., Wang Z. P., Huang Y., Liu L., *Sci. China Chem.*, **2017**, *60*(5), 621—627
[102] Crich D., Banerjee A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*(33), 10064—10065
[103] Easton C. J., Hutton C. A., Roselt P. D., Tiekink E. R., *Tetrahedron*, **1994**, *50*(24), 7327—7340
[104] Malins L. R., Giltrap A. M., Dowman L. J., Payne R. J., *Org. Lett.*, **2015**, *17*(9), 2070—2073
[105] Chen J., Wan Q., Yuan Y., Zhu J. L., Danishefsky S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*(44), 8521—8524
[106] Yang R. L., Pasunooti K. K., Li F. P., Liu X. W., Liu C. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*(38), 13592—13593
[107] Marin J., Didierjean C., Aubry A., Casimir J. R., Briand J. P., Guichard G., *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*(1), 130—141

[108] Merkx R., de Bruin G., Kruithof A., van den Bergh T., Snip E., Lutz M., Oualid F. E., Ovaa H., *Chem. Sci.*, **2013**, *4*(12), 4494—4498
[109] van der Heden van Noort G. J., Kooij R., Elliott P. R., Komander D., Ovaa H., *Org. Lett.*, **2017**, *19*(24), 6490—6493
[110] Ajish Kumar KS., Haj-Yahya M., Olschewski D., Lashuel H. A., Brik A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*(43), 8090—8094
[111] Padrón J. M., Kokotos G., Martín T., Markidis T., Gibbons W. A., Martín V. S., *Tetrahedron: Asymmetr.*, **1998**, *9*(19), 3381—3394
[112] El Oualid F., Merkx R., Ekkebus R., Hameed D. S., Smit J. J., de Jong A., Hilkmann H., Sixma T. K., Ovaa H., *Angew. Chem.*, **2010**, *122*(52), 10347—10351
[113] Dao Y. K., Han L., Wang H. X., Dong S. W., *Org. Lett.*, **2019**, *21*(9), 3265—3270
[114] Zhang X., King-Smith E., Renata H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*(18), 5037—5041
[115] Chen J., Wang P., Zhu J. L., Wan Q., Danishefsky S. J., *Tetrahedron*, **2010**, *66*(13), 2277—2283
[116] Harpaz Z., Siman P., Kumar K. A., Brik A., *ChemBioChem*, **2010**, *11*(9), 1232—1235
[117] Tan Z. P., Shang S. Y., Danishefsky S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*(49), 9500—9503
[118] Ding H., Shigenaga A., Sato K., Morishita K., Otaka A., *Org. Lett.*, **2011**, *13*(20), 5588—5591
[119] Siman P., Karthikeyan S. V., Brik A., *Org. Lett.*, **2012**, *14*(6), 1520—1523
[120] Hernández J. N., Ramírez M. A., Martín V. S., *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*(3), 743—746
[121] Malins L. R., Cergol K. M., Payne R. J., *ChemBioChem*, **2013**, *14*(5), 559—563
[122] Pasunooti K. K., Banerjee B., Yap T., Jiang Y. J., Liu C. F., *Org. Lett.*, **2015**, *17*(24), 6094—6097
[123] Pasunooti K. K., Yang R. L., Banerjee B., Yap T., Liu C. F., *Org. Lett.*, **2016**, *18*(11), 2696—2699
[124] Thompson R. E., Chan B., Radom L., Jolliffe K. A., Payne R. J., *Angew. Chem.*, **2013**, *37*(125), 9905—9909
[125] Guan X. Y., Drake M. R., Tan Z. P., *Org. Lett.*, **2013**, *15*(24), 6128—6131
[126] Cergol K. M., Thompson R. E., Malins L. R., Turner P., Payne R. J., *Org. Lett.*, **2014**, *16*(1), 290—293
[127] Malins L. R., Cergol K. M., Payne R. J., *Chem. Sci.*, **2014**, *5*(1), 260—266
[128] Sayers J., Thompson R. E., Perry K. J., Malins L. R., Payne R. J., *Org. Lett.*, **2015**, *17*(19), 4902—4905
[129] Gao X. F., Du J. J., Liu Z., Guo J., *Org. Lett.*, **2016**, *18*(5), 1166—1169
[130] Lee M., Neukirchen S., Cabrele C., Reiser O., *J. Pept. Sci.*, **2017**, *23*(7/8), 556—562
[131] Qiu W. T., Shi S., Li R. N., Lin X. F., Rao L. M., Sun Z. K., *Chin. J. Chem.*, **2021**, *39*(5), 1255—1258
[132] Venneti N. M., Samala G., Morsy R. M. I., Mendoza L. G., Isidro-Llobet A., Tom J. K., Mukherjee S., Kopach M. E., Stockdill J. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(2), 1053—1061
[133] Jing R., Walczak M. A., *Org. Lett.*, **2024**, *26*(13), 2590—2595
[134] Jin K., Li T. L., Chow H. Y., Liu H., Li X. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(46), 14607—14611
[135] Sun Z. Q., Ma W. J., Cao Y. H., Wei T. Y., Mo X. Y., Chow H. Y., Tan Y., Cheung C. H. P., Liu J. M., Lee H. K., Tse E. C. M., Liu H., Li X. C., *Chem.*, **2022**, *8*(9), 2542—2557
[136] Desmet R., Boidin-Wichlacz C., Mhidia R., Tasiemski A., Agouridas V., Melnyk O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(18), e202302648
[137] Mitchell N. J., Malins L. R., Liu X., Thompson R. E., Chan B., Radom L., Payne R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*(44), 14011—14014
[138] Mueller L. K., Baumruck A. C., Zhdanova H., Tietze A. A., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2020**, *8*, 162
[139] Shi W. W., Shi C. W., Wang T. Y., Li Y. L., Zhou Y. K., Zhang X. H., Bierer D., Zheng J. S., Liu L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(1), 349—357

(Ed.: L, W, K)