

天然半胱氨酸化学偶联修饰技术研究进展

黄利娜, 杨超, 邹明, 刘慧涛*

(河南工业大学 前沿交叉科学与技术学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 蛋白质化学修饰是生物医药领域大分子药物, 特别是抗体偶联药物开发所需的核心底层技术。半胱氨酸侧链携带高反应活性巯基 (-SH), 且其在天然蛋白质中丰度较低, 使其成为实现蛋白质共价生物偶联的理想修饰位点。文章系统归纳生理环境下天然半胱氨酸两大类主流共价偶联策略, 即游离单巯基官能化反应与二硫键还原重桥联反应, 并对比不同修饰反应试剂的结构、水相反应工艺的优缺点及适用范围。现阶段该技术仍面临反应位点选择性欠佳、偶联产物体内循环稳定性不足、连接子生物相容性受限等突出问题。后续研究重点应聚焦高选择性、反应条件温和的新型偶联试剂设计, 优化水相绿色高效偶联工艺, 助力半胱氨酸修饰技术在生物医药领域实现产业化规模化应用。

关键词: 半胱氨酸; 生物偶联; 蛋白; 多肽; 抗体偶联药物

中图分类号: O62 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283 (2026)

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2026.0203

Advances in the Chemical Conjugation of Native Cysteine: Techniques and Applications HUANG Li-na, YANG Chao, ZOU Ming, LIU Hui-tao* (College of Advanced Interdisciplinary Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The chemical modification of proteins is a core enabling technology for developing macromolecular therapeutics in biomedicine, and is pivotal in constructing antibody-drug conjugates. Among the residues available for bioconjugation, the cysteine side chain is particularly promising because it contains a highly nucleophilic and reactive thiol (-SH) group. This amino acid is an ideal modification site for the site-selective covalent bioconjugation of proteins, owing to the relatively low abundance of free cysteine residues in most natural proteins, and offers a favorable balance between reactivity and selectivity, which is seldom achieved with more abundant amino acid residues such as lysine. This article summarizes two mainstream covalent conjugation strategies that operate under mild, physiologically relevant conditions for native, unmodified cysteine residues. The first strategy focuses on directly functionalizing free single thiol moieties through thiol-ene, thiol-maleimide, or related alkylation reactions, which enable the straightforward conjugation of relevant units to an accessible surface cysteine. The second, more sophisticated strategy involves selectively reducing the interchain or structurally labile disulfide bonds, followed by rebridging, wherein the newly liberated thiol pairs are reconstituted using bis-functionalized reagents to preserve the native three-dimensional architecture and overall stability of the protein. In addition, this review compared the structural features of various modification reagents, including their linkers, spacer geometries, and reactive warheads, and evaluated the respective advantages and limitations, and applications of different aqueous-phase reaction processes in terms of their yield, kinetics, and substrate compatibility. Despite considerable progress, this technology continues to face several challenges, such as insufficient reaction-site selectivity, which may lead to heterogeneous products; inadequate in vivo circulation stability of certain conjugation products arising from the thiol exchange or premature cleavage; and the limited biocompatibility of currently available linkers. Therefore, future research should focus on the rational design of novel precision conjugation reagents that combine high selectivity with mild reaction conditions, in addition to continuously optimizing green and efficient aqueous-phase conjugation processes. Successfully resolving these issues will advance the industrial and large-scale application of cysteine-specific modification technologies across the biopharmaceutical sector.

Key words: cysteine; bioconjugation; protein; peptide; antibody drug conjugates

蛋白质是生物体的核心生物大分子之一, 广泛参与各类生命活动, 在结构维持、反应催化、信号调控、物质跨膜转运及免疫应答等关键生理过程中均发挥不可替代的作用。生物体中, 蛋白质功能的动态精准调控高度依赖蛋白质翻译后修饰 (PTM), 这类修饰是核糖体完成多肽链基础合成后, 通过内源酶促反应对氨基酸残基进行的定向共价改造, 可精准调控蛋白质的空间构象、生物学活性、亚细胞定位与分子间互作, 干预细胞增殖、损伤修复、凋亡等核心生命进程。研究人

员通过体外模拟PTM修饰机制, 突破了天然酶促修饰的场景限制, 发展出自由度更高、适配性更广的人工可控蛋白质化学修饰技术体系, 成为当前化学生物学、功能蛋白定向改造、创新生物医药开发的核心支撑技术之一^[1]。

作为该技术体系最具转化潜力的分支之一, 蛋白质化学修饰技术可实现功能基团在蛋白质特定氨基酸位点的精准接枝, 在药物研发、诊断检测及生物材料领域均具备极高的应用价值: 在肿瘤治疗领域, 抗体偶联药物 (ADCs) 依托精准生

收稿日期: 2026-08-09; 修回日期: 2026-09-09; 接受日期: 2026-09-15

基金项目: 河南工业大学博士基金项目 (2023BS034)。

作者简介: 黄利娜 (1991-), 女, 河南新乡人, 硕士, 助教, 主要研究方向为蛋白质修饰及食品营养成分分析。

通讯作者: 刘慧涛, E-mail: caist_hliu@haut.edu.cn。

物偶联技术实现细胞毒性药物的靶向递送，可特异性识别并杀伤肿瘤细胞，相较于传统化疗手段，显著降低脱靶毒副作用、提升抗肿瘤疗效，已成为精准肿瘤治疗领域的前沿核心技术^[2]。在医学诊断领域，基于功能化修饰构建的蛋白质荧光探针，可将微观蛋白质结构互作变化转化为可视化荧光信号，为解析生命活动机制提供了高灵敏、动态化的检测手段，大幅提升了免疫荧光检测、放射免疫分析等诊断技术的灵敏度与特异性^[3]。在生物材料领域，蛋白质基材料凭借优异的生物相容性、可降解性与生物活性，被广泛应用于组织工程修复、靶向药物递送、创面愈合修复等场景，是生物医用材料的重要研究方向^[4]。

在蛋白质的20种天然氨基酸中，半胱氨酸凭借侧链独特的巯基(-SH)结构，兼具强亲核反应活性与可逆氧化还原特性，是最适用于体外化学修饰的氨基酸位点。半胱氨酸在蛋白质序列中整体丰度较低，但广泛分布于97%的人体蛋白质中，且修饰位点高度保守，是抗体偶联最常用的氨基酸^[5,6]。生命体可通过巯基氧化反应形成分子内或分子间二硫键(-S-S-)，也可通过巯基-二硫键交换反应实现蛋白结构动态重塑，依托该机制完成蛋白翻译后修饰，保障蛋白正常生理功能^[7,8]。

目前研究人员围绕半胱氨酸巯基修饰，已形成单巯基官能化反应与二硫键还原重桥联反应两大主流技术体系，实现蛋白质的定点、可控化学修饰。其中，单巯基官能化以蛋白固有游离巯基或二硫键还原后生成的单巯基为修饰位点，通过一对一的特异性化学反应构建稳定的含硫偶联产物，反应条件温和、操作简便、产物选择性优异^[9]。二硫键还原重桥联反应则通过还原蛋白天然二硫键暴露双巯基，再利用双功能连接器实现一对二的桥联重构，在修饰的同时可稳定蛋白空间骨架，两类技术互为补充，适配不同的应用场景^[10]。现阶段，研究者已陆续开发出基于马来酰亚胺、联烯酰胺等系列巯基正交偶联试剂，同时二硫代缩醛等新型试剂的引入，进一步丰富了半胱氨酸修饰体系，可高效接枝荧光基团、细胞毒性药物等功能单元，有效规避传统非特异性修饰导致的蛋白结构破坏与功能失活^[11,12]。

文章综述了天然半胱氨酸残基化学修饰的最新进展，重点探讨其在生物医学技术领域的应用。利用半胱氨酸独特的巯基在蛋白质中的低丰度特征，研究人员开发出可在生理条件下进行的选择性修饰策略。文章系统比较了单巯基官能化技术（如马来酰亚胺偶联、环辛炔反应）与二硫键重桥联技术（如膦酰胺/烯丙胺连接体），从技术特征、适用范围与局限性等维度进行了系统评估；并进一步探讨了上述策略在靶向药物递送、生物传感及蛋白质工程中的具体应用。此外，文章还总结了多种调控巯基生物共轭产物稳定性的方法。尽管该类技术已具备优异的转化应用前景，

但反应特异性不足、共轭产物稳定性受限、生物相容性待提升仍是该领域面临的核心挑战，也是未来研究需优先突破的关键方向。

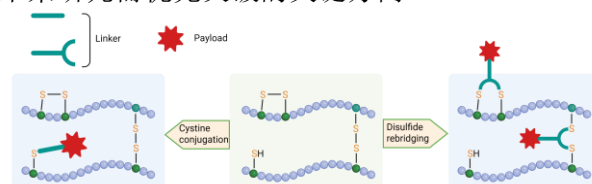


图1 半胱氨酸偶联修饰的两种策略^[9, 10]

Fig.1 Two strategies for cysteine residue functionalization^[9, 10]

1 单巯基官能化应用于半胱氨酸修饰

1.1 半胱氨酸与马来酰亚胺的偶联反应

ADCs 是一类靶向治疗药物，通常用于癌症治疗。通过单克隆抗体递送具有细胞毒性的小分子毒素，选择性地消灭恶性细胞，同时保留健康细胞^[13,14]，该策略获得成功的关键在于抗体和药物之间的共价连接^[15]。截止到 2025 年 8 月上市的 19 款 ADCs 中，有 13 款是用马来酰亚胺作为半胱氨酸偶联试剂^[16]。如图 2 所示，马来酰亚胺具有独特的反应活性，反应主要针对 IgG1 抗体的 4 对链间二硫键，最大药物-抗体比值（DAR）可达 8^[17]，比如大获成功的德曲妥珠单抗^[18]。然而马来酰亚胺与巯基反应的产物稳定性较差，会发生逆迈克尔加成反应，或者通过水解开环，使马来酰亚胺与巯基断开连接，导致递送至肿瘤细胞的细胞毒素剂量低于预期水平，降低治疗效果，同时导致有效药物成分提前释放，产生严重的毒副作用^[19,20]。

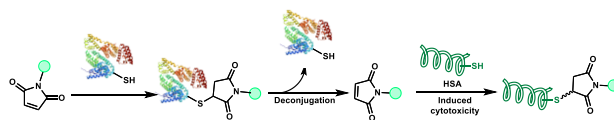


图2 马来酰亚胺-巯基偶联反应及产物稳定性^[19,20]

Fig.2 Maleimide-thiol bioconjugation and the stability of the resulting product^[19,20]

为了解决这些问题，2017 年，南开大学 Zhou 课题组^[21]通过迈克尔加成在 5-甲基吡咯烷酮骨架上实现硫醇特异性且可无痕移除的生物偶联。5-甲基吡咯烷酮衍生物（5MPs）是一类具有高度半胱氨酸选择性、可逆且无痕解离特性的生物正交偶联试剂。其可通过伯胺与醛基的缩合反应一步高效构建，操作简便、产率高。相较于常用硫醇反应试剂（如马来酰亚胺类），5MPs 在生理 pH 7.4 及 37 °C 条件下展现出显著提升的水解稳定性与优异的半胱氨酸特异性。硫醇对 5MPs 的 Michael 加成反应动力学快速、副反应极少，且不引入新的手性中心，有利于保持偶联产物的结构均一性。所得共轭物可在温和碱性条件（pH 9.5，碳酸盐缓冲液）下通过逆 Michael 反应定量释放游离硫醇；亦可在中性条件（pH 7.5）下借助外源硫醇实现高效、选择性硫醇交换解离。该

双重可控释放机制使 5MPs 特别适用于需时空精准调控的药物偶联体系及可逆性蛋白质修饰策略,例如作为临时性硫醇保护基或可控释放型载药连接子。该研究以大肠杆菌乙酰羟酸合酶同工酶 I (EcIlvH) 为模型蛋白,验证了 5MPs 在位点特异性蛋白固定化及活性蛋白复合物原位捕获中的实用性。

Conjugation of 5-methylene pyrrolone (5MP) with cysteine

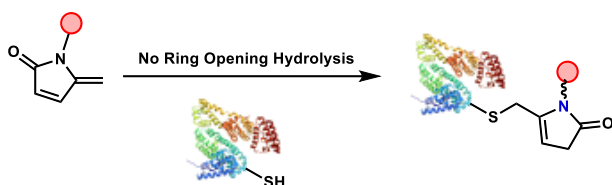


图3 基于 5-甲基吡咯烷酮骨架的硫醇特异性生物偶联^[21]

Fig.3 Thiol-selective bioconjugation with the 5-methylpyrrolidinone scaffold^[21]

2019 年,南京大学 Cao 课题组^[22]利用单分子力学手段开展研究,发现对硫代琥珀酰亚胺键施加适宜拉伸外力,可显著增强马来酰亚胺-硫醇加合物的稳定性;如图 4 所示,其本质是利用传统力化学中力诱导化学键解离的作用模式,达成了对相邻化学键的非经典力学稳定效果。单分子动力学分析结合宏观结构表征进一步揭示,在力依赖的动力学控制下,琥珀酰亚胺环水解反应相较于逆迈克尔反应占据优势,生成不易发生消除降解的衍生物。依托该创新力化学路径,仅采用温和超声处理即可向马来酰亚胺-硫醇加合物施加机械作用力,进而构建结构稳定的聚合物-蛋白质偶联物。研究结果直观体现了机械力在介导关键化学转化、调控产物结构方面的巨大应用潜力。

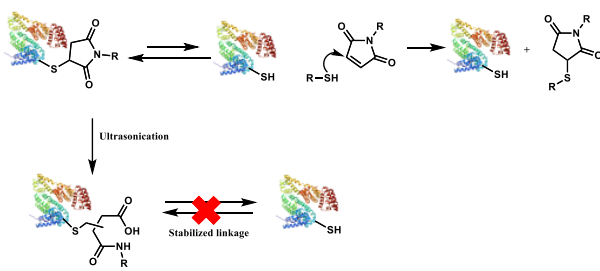


图4 通过超声施加机械力调控巯基-马来酰亚胺加成产物的稳定性^[22]

Fig.4 Regulating the stability of thiol-maleimide addition adducts via ultrasound-induced mechanical force^[22]

1.2 半胱氨酸巯基与炔基的偶联反应

2013 年, Waser 课题组^[23]开发了一种高效、高化学选择性的硫醇炔基化反应,以高价碘炔转移试剂 TIPS-EBX (1-[(三异丙基硅基)乙炔基]-1,2-苯并碘氧杂环戊烷-3 (1H)-酮) 为核心,在温和条件下仅需 5 min 即可完成反应 (图 5a);成功实现半胱氨酸衍生物及含半胱氨酸肽的炔基化修饰,并通过 CuAAC 反应完成荧光团标记,为合成化学、化学生物学及材料科学领域提

供了新型硫醇功能化工具。2015 年,该团队进一步筛选出基于叠氮功能化炔基苯并碘氧杂环戊烷试剂 (JW-RF-010) 的高效化学蛋白质组学方法,在生理条件下可快速、高化学选择性地与蛋白质中的半胱氨酸残基进行炔基化,水相稳定性优异 (14 d 分解率 < 3%),且对活细胞毒性低 (图 5b)^[24]。2020 年,该课题组进一步拓展了高价碘乙炔化试剂,成功实现对多肽及蛋白质中巯基的高效、特异性乙炔化修饰。该研究不仅完成了体外体系的反应验证与性能表征,还开展了活细胞内的靶向修饰探索,为生物分子的精准功能化提供了更具实用性的工具^[25]。

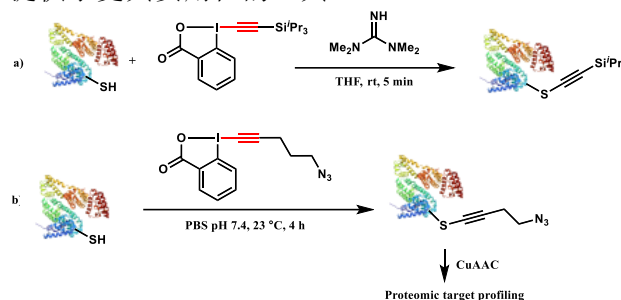


图5 含炔基高价碘试剂对多肽和蛋白质的功能化^[20, 21]

Fig.5 Site-selective peptide and protein functionalization enabled by alkynyl hypervalent iodine(III) reagents^[20, 21]

2014 年, Wagner 等^[26]开发了一类新型试剂 3-芳基丙炔腈 (APN),可在水相环境中实现半胱氨酸偶联。这种水解稳定性极高的试剂对半胱氨酸具有优异的化学选择性。在一系列可追踪氨基酸衍生物模型的研究中,APN 介导的标记方法与其他半胱氨酸选择性方法进行了对比评估。该方法的特异性还通过胰蛋白酶消化溶菌酶得到的肽混合物进一步验证。此外,APN 与半胱氨酸的共轭物在水溶液、人血浆及活细胞中具有卓越的稳定性,使这种新型硫醇-点击反应成为生物偶联应用中极具前景的方法。

胺基-硫醇偶联是制备 ADC 最常用的方法,通常通过使用一端具有活化酯基、另一端具有马来酰亚胺基的杂双功能试剂来实现。然而,最近研究表明,基于马来酰亚胺的偶联物在血液循环中稳定性较差,可能影响其治疗效果。为解决这一问题,2015 年 Wagner 课题组^[27]开发了一种杂双功能试剂 4-((4-氰乙炔基)苯甲酰氧)-2,3,5,6-四氟苯磺酸钠 (CBTF),用于氨基与硫醇的偶联反应。该试剂以上述报道的 3-芳基丙炔腈 (APN) 功能取代了马来酰亚胺,从而制备出稳定性显著更高的偶联物。利用该试剂已成功合成了多种抗体-染料偶联物,结果表明其在人血浆中的稳定性优于由马来酰亚胺衍生的偶联物 (图 6)。

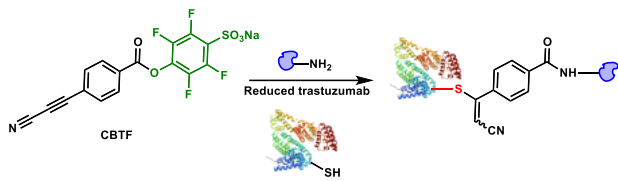


图 6 双功能连接子试剂 CBTF^[27]

Fig.6 Bifunctional cross-linker reagent CBTF^[27]

2023 年, 河南工业大学 Lor 课题组^[28]报道了一种新型含硅炔酮试剂, 该试剂可在其他亲核试剂存在下特异性识别游离硫醇。这一高效的硫醇特异性方法可在生物相容性条件下 (无金属、无添加剂、常温及中性 pH) 顺利进行, 且几乎达到 100% 的原子经济性。尤为值得注意的是, 该反应仅在缓冲溶液中有效, 通常能生成稳定且单功能化的产物, 并完整保留硅基团。这一有趣的结果可能源于缓冲液中盐的存在有利于形成更具活性的硫代亚胺离子。由于硅基团具有良好的兼容性, 该方法可将硅官能团引入共轭加合物中, 从而增强其亲脂性。除简单的脂肪族和芳香族硫醇外, 这种生物相容性方法还可用于硫醇类蛋白质、糖类及药物的标记。此外, 基于硅的无机性质以及该共轭化学在生物系统中的应用, 将成为多学科研究的重点 (图 7)。

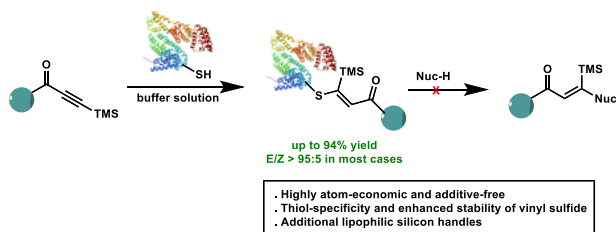


图 7 罗德平课题组报道新型 β -硅基炔酮偶联试剂体系^[28]

Fig.7 A novel thiol-specific β -Silyl bioconjugation reagent system reported by Loh group^[28]

2019 年, Vilarrasa 小组^[29]开发了一种基于硫代迈克尔加成反应的偶联方法, 该方法可作为将巯基 (Cys) 连接到药物和标记物的替代方案, 替代目前最常用的马来酰胺试剂。在 37°C、pH 7.4 的水溶液中, 将氨基转化为丙氨酸胺后加入 Cys 衍生物, 即可形成氧代丙烯-1,3-二基连接体。该连接体具有优异的 Z 选择性, 且无二级反应发生, 未观察到与其他硫醇的交换反应 (图 8)。

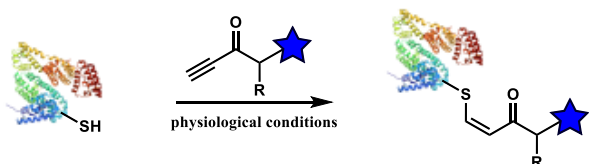


图 8 用 (Z)-氧代丙烯-1,3-二基连接子标记半胱氨酸残基^[29]

Fig.8 Cysteine residue labeling with the (Z)-Oxopropene-1,3-diyl linker^[29]

2024 年, Zhao 团队^[30]发现了一种高效、化学选择性、区域选择性和立体选择性的氮杂环硫醇化反应, 可精准地对肽和蛋白质进行修饰, 且

能特异性靶向半胱氨酸 (Cys) 残基的巯基。该方法可在水相缓冲液中进行, 与多种蛋白质完全兼容, 包括小分子模型蛋白和抗体, 且不会影响其完整性和功能。更重要的是, 该反应仅生成对应共轭物的 Z-异构体, 且稳定性显著提升, 为肽类和蛋白质治疗提供了精确的策略。该方法在肽类和蛋白质化学生物学中的潜在应用, 通过将半胱氨酸与多种含酰胺基功能分子 (如小分子药物、荧光/亲和标签以及 PEG 聚合物) 进行生物偶联进一步得到验证。此外, 该方法还通过半胱氨酸-烯丙化反应在氧化还原蛋白组学分析中表现出高效性。总体而言, 该研究为半胱氨酸特异性功能化提供了一种新颖的生物正交工具, 将在肽/蛋白质偶联物的合成中具有广泛应用前景 (图 9)。

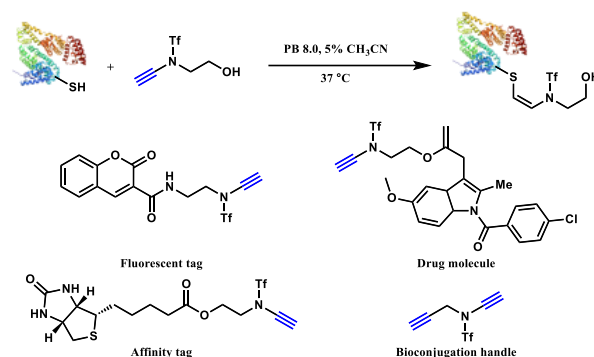


图 9 通过吡啶甲酰胺的水解硫化实现半胱氨酸修饰^[30]

Fig.9 Cysteine modification enabled by hydrolytic sulfuration of picolinamide^[30]

1.3 半胱氨酸与不饱和烯酮化合物反应

2016 年, Bernardes 课题组^[31]开发了一类基于羰基丙烯酸酯的蛋白质偶联试剂, 实现了对蛋白质中半胱氨酸 (Cys) 的化学不可逆修饰; 该试剂在生物相容条件下 (近中性 pH、水溶液) 与半胱氨酸快速发生迈克尔加成反应, 产物在血浆和谷胱甘肽 (GSH) 环境中稳定, 且不与赖氨酸 (Lys) 等其他氨基酸交叉反应; 通过将该试剂与荧光团、PEG 或药物分子偶联, 成功实现与膜联蛋白、白蛋白、曲妥珠单抗等蛋白质或抗体的精准修饰, 修饰后生物分子仍保留生物功能性, 为诊断和治疗用偶联物的制备提供了高效工具 (图 10)。

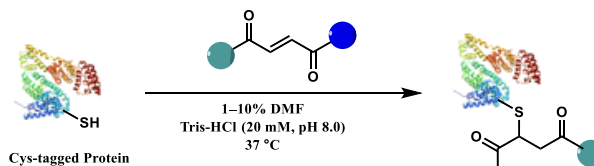


图 10 羰基丙烯酸与蛋白质半胱氨酸的偶联^[31]

Fig.10 Site-selective bioconjugation of cysteines with carbonyl acrylic acid reagents^[31]

2017 年, Chiba 课题组^[32]开发了一种基于 2-叠氮丙烯酸酯试剂的位点特异性双功能化修饰新策略。该策略可在 pH 7.4、23 °C 的温和生理条件下, 与多肽及天然蛋白质 (如含单一游离半胱

氨酸的牛血清白蛋白 BSA) 中的半胱氨酸巯基发生高选择性迈克尔加成反应, 向生物分子高效引入叠氮基团。在此基础上, 通过叠氮与炔烃的环加成反应可进一步偶联第二种功能模块, 实现单一半胱氨酸位点的分步二次功能修饰, 最终构建得到双功能化多肽与蛋白质。依托该方法, 荧光团、生物素、PEG 等多种功能分子均可被精准引入生物分子体系, 科研人员已成功制备出双标记多肽、双色荧光标记 BSA 以及 BSA-荧光素-生物素缀合物。该修饰体系条件温和, 全程不会破坏生物分子的天然空间结构与生物活性, 为新型先进生物探针、蛋白治疗药物的研发提供了灵活、高效的化学修饰技术手段 (图 11)。

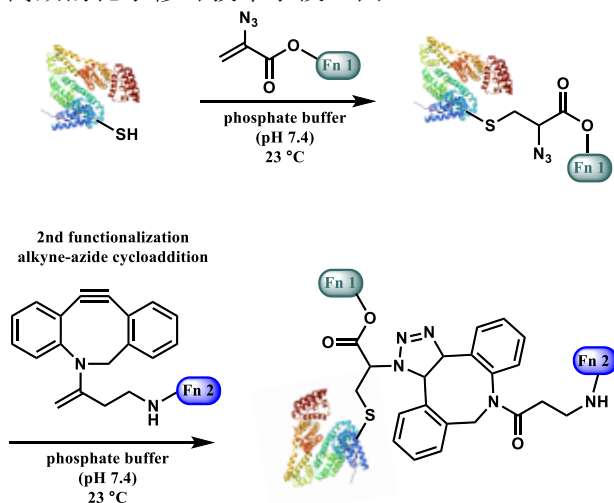


图 11 2-叠氮丙烯酸酯修饰蛋白质中半胱氨酸^[32]
Fig.11 Modification of protein cysteine residues with 2-azidoacrylate^[32]

2022 年, Bernardes 等^[33]开发了一种基于单取代环丙酮 (CPO) 试剂的蛋白质精准修饰策略, 解决了特定半胱氨酸残基选择性修饰的核心挑战。该试剂在温和生物相容条件下, 可通过 1,2-氨基硫醇反应特异性修饰蛋白质的 N 端半胱氨酸残基, 形成稳定连接, 且不受内部暴露半胱氨酸的干扰; 借助该策略, 可先修饰 N 端半胱氨酸, 再用传统方法修饰内部半胱氨酸, 成功制备出双偶联蛋白; 该方法为构建复杂多标记生物偶联提供了高效工具, 适用于生物过程研究及治疗药物开发 (图 12)。

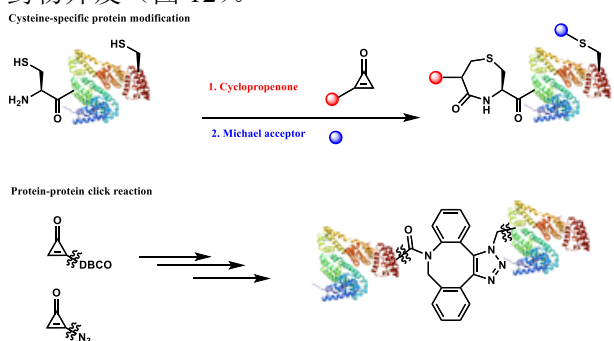


图 12 基于单取代环丙酮的半胱氨酸偶联^[33]
Fig. 12 Cysteine bioconjugation based on monosubstituted cyclopropanone^[33]

此外, 2024 年河南工业大学 Luo 课题组^[34]开发了一种新型蛋白偶联方法, 并设计合成了新型含硅生物共轭试剂。该试剂可与硫醇发生特异性反应, 其中硅元素的引入大幅提升了反应的化学选择性, 同时有效抑制逆向反应的发生, 性能优于传统巯基修饰试剂。该方法通用性良好, 可适配多种硫醇底物与不饱和羰基化合物, 能够获得中高收率的反应产物。整套反应可在生物相容的温和条件下进行, 完全适用于蛋白质生物偶联修饰。所得偶联产物在复杂生物体系中具备优异稳定性, 在抗体-药物偶联物的制备领域展现出广阔的应用潜力。同时, 产物结构中的硅基团可为可控药物释放、无机材料跨界联用等研究提供全新思路。这款新型含硅硫醇特异性生物偶联试剂, 为生物分析科学与药物化学研究提供了全新技术支撑, 也为生物偶联及药物化学领域的创新发展注入了新动力 (图 13)。

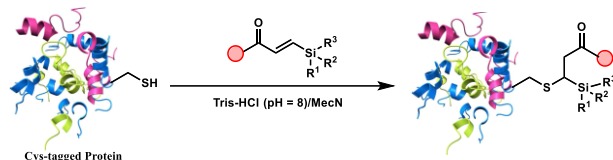


图 13 含硅硫醇特异性生物共轭试剂^[34]
Fig.13 Silicon-containing thiol-specific bioconjugation reagents^[34]

1.4 半胱氨酸与 1,2,3-三嗪衍生物特异性反应

2024 年, Wang 团队^[35]首次报道了基于取代 1,2,3-三嗪衍生物与巯基的特异性生物偶联新策略。该方法以天然半胱氨酸巯基为精准修饰位点, 可高效实现多种含半胱氨酸多肽与蛋白质的修饰。通过调控 1,2,3-三嗪母核的官能团结构, 能够有序完成多肽缀合、环化以及二聚化等多种功能反应, 显著拓宽了该体系的适用场景。同时, 三嗪与半胱氨酸反应后可原位生成醛基, 为后续进一步偶联其他生物功能分子、实现蛋白质二次精准标记提供了便捷的反应位点。目前, 该团队正持续拓展该技术在各类生物活性多肽与功能蛋白靶点中的应用研究, 有望为新型肽类药物的研发与产业化提供全新的技术支撑 (图 14)。

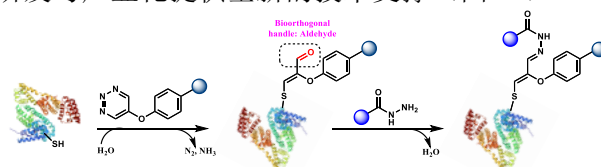


图 14 1,2,3-三嗪衍生物与半胱氨酸的特异性偶联^[35]
Fig.14 Cysteine-specific conjugation of 1,2,3-triazine derivatives^[35]

1.5 半胱氨酸与吡啶衍生物特异性反应

现有生物修饰方法难以同时满足“高选择性、可调节性、多功能适配性”的需求, 如肽环化与蛋白修饰需不同策略, 可逆修饰工具匮乏。而可调节连接子在 ADCs 开发中展现出巨大前景^[36,37]。2024 年, 北京大学 Li 团队^[38]开发了一种以吡啶衍生物-硫醇为骨架的多功能修饰方法, 通

过合理调控取代基的电子效应, 实现了对肽和蛋白质中半胱氨酸残基的可调节修饰 (图 15a)。该方法具有高度的反应活性以及可调节性能, 通过设计合成模型肽, 在含 25% MeCN 的 PBS 缓冲液条件下, 肽链中的半胱氨酸巯基与二卤素化吡啶在温和条件下进行 Cys-Cys 环化, 成功应用于 GSH 肽环化以及去环化 (图 15b)。该方法可实现抗体可切割缀合、半胱氨酸蛋白酶 (木瓜蛋白酶 / TEV 蛋白酶) 可逆抑制及蛋白质组标记, 修饰后生物分子可在谷胱甘肽 (GSH) 作用下恢复天然状态, 且环化肽的细胞穿透性和酶解稳定性显著提升, 为化学生物学和药物研发提供了灵活高效的工具。

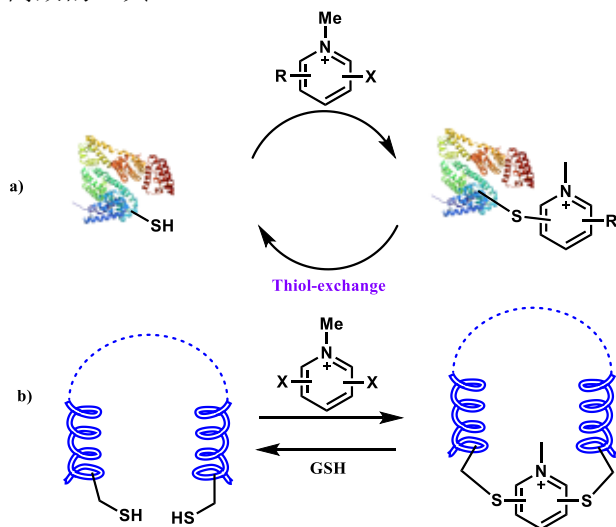


图 15 吡啶衍生物与半胱氨酸巯基的偶联反应^[38]

Fig.15 Conjugation reaction between pyridine derivatives and cysteine thiols^[38]

兰州大学许兆青团队开发出一种基于吡啶骨架的可编程化学选择性序贯偶联平台, 在同一个吡啶母核上同时引入噻吩鎓离去基团与氟反应位点, 可实现烷基胺与半胱氨酸的正交分步偶联, 构建无手性、高稳定性的芳基-半胱氨酸连接键^[39]。该平台便于肽的直接后期修饰和组装, 以及蛋白质的功能组装。特别是在 ADC 领域, 吡啶连接物的坚固稳定性与所得偶联物的强效治疗效果相结合, 为有前景的 ADC 药物提供了直接的途径。鉴于这种连续连接策略的简单性和模块性, 预计该平台能够为生成稳定的下一代生物偶联物和 ADC 提供一种多功能的连接解决方案。

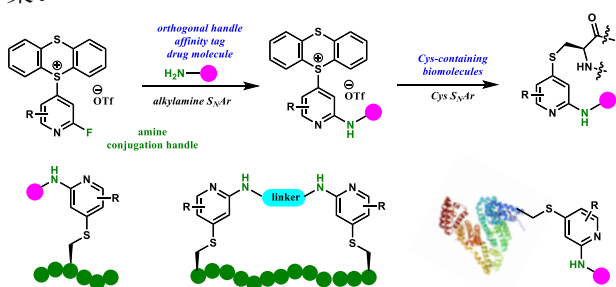


图 16 基于吡啶的化学选择性串联偶联平台用于稳定的

模块化烷基胺半-胱氨酸生物偶联反应^[39]

Fig.16 Pyridine-based chemoselective sequential conjugation platform for stable and modular alkylamine-Cys bioconjugation^[39]

1.6 镍金属催化半胱氨酸偶联反应

基于半胱氨酸的巯基偶联技术除了 ADCs 外, 在多肽偶联药物 (PDCs)、环肽等开发中大显身手^[40,41]。2023 年, Messaoudi 课题组^[42]报道了在温和反应条件下镍催化肽与芳基卤化物偶联的电化学方法, 以 $\text{NiBr}_2 \cdot \text{diglyme}$ 为催化剂、 di-tBubpy 为配体、 LiBr 为电解质, 实现肽与芳基、杂芳基、烯基和炔基卤化物的位点选择性交叉偶联, 产物产率最高达 89%; 该方法兼容保护型和非保护型肽 (包括含酪氨酸、色氨酸等电敏感氨基酸的肽), 可通过分子间偶联制备硫代芳基肽, 也能经分子内偶联构建 14~20 元环肽。因此, 该方法可作为 Pd 催化反应或光氧化还原过程的补充手段, 为肽生物偶联物及环肽的绿色合成提供了新型高效工具 (图 16)。

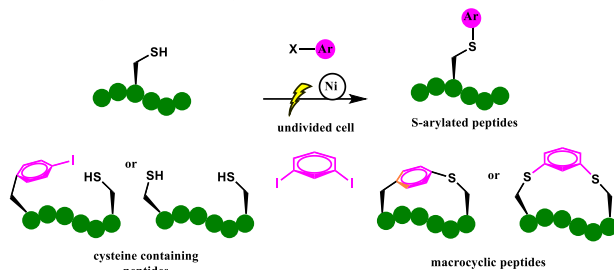


图 17 半胱氨酸巯基与芳基卤化物的偶联反应^[42]

Fig.17 Conjugation between cysteine thiols and aryl halides^[42]

同年, Lang 团队^[43]提出了一种镍催化光氧化还原介导的生物缀合方法, 在 450 nm 蓝光照射、室温条件下, 通过镍金属为催化剂以及加入光催化剂, 实现肽和抗体中半胱氨酸残基与芳基溴化物的位点特异性 S-芳基化 (图 18); 该方法兼容工程化半胱氨酸抗体和天然链间二硫键还原后的抗体, 可高效偶联生物素、螯合剂、荧光探针及奥里斯他汀 E、DM1、DXd 等细胞毒性药物, 制备的 ADC 药物-抗体比率 (DAR) 为 1.0~7.7, 在 Trop-2 阳性癌细胞中展现出纳摩尔级细胞毒性 ($\text{IC}_{50}=0.03\sim0.9 \text{ nmol/L}$), 且对 Trop-2 阴性细胞选择性高于 300 倍, 为 ADC 等生物治疗药物的高效制备提供了新型工具。通过该方法制备的新型 ADC 将具备载荷释放可控、体内稳定性高的特点, 在肿瘤靶向治疗中展现出良好的应用前景, 同时为蛋白质修饰领域提供一种高效、通用的化学工具, 推动生物治疗药物的创新发展。

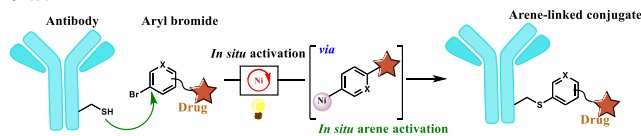


图 18 镍催化半胱氨酸巯基与芳基溴化物的偶联反应^[43]

Fig.18 Nickel-catalyzed conjugation between cysteine thiols and aryl bromides^[43]

1.7 半胱氨酸巯基芳基化反应

金属介导的化学反应如今在体外生物分子修饰中应用日益广泛。然而，某些金属所表现出的毒性以及潜在毒性限制了有机金属试剂在更复杂的生物环境（如活细胞内）中的应用。配体在调节过渡金属的反应活性和可及性方面起着关键作用。**Benjamin** 团队^[44]提出了一种创新的生物相容性配体策略，以四甲基乙二醇（TMEDA）作为配体的芳基镍试剂，在温和条件下，实现肽和蛋白质中半胱氨酸残基巯基位点的特异性芳基化反应，解决了传统金属毒性高以及难以应用于活细胞的核心难题。该研究揭示，由有机镍介导的 S-芳基化反应能够与生物相容性配体进行柔性螯合，而不会破坏相应芳基镍试剂的化学活性，从而实现安全、选择性 C-S 键形成的芳基化反应体系。这些平衡的系统在体外及活的原核和真核细胞中对多种蛋白质底物均表现出足够的安全性。该研究能够以足够高的灵敏度对人类细胞中具有反应性的半胱氨酸进行深入的化学分析，从而检测出新兴的细胞内病毒和细菌病原体中可共价靶向的蛋白质。因此，通过生物相容性配体的平衡调控，为过渡金属在活体系统中的广泛应用开辟了道路（图 19）。

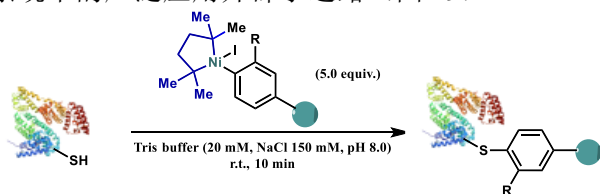


图 19 半胱氨酸巯基芳基化反应^[44]

Fig.19 Arylation of cysteine thiol group^[44]

同时该工作在靶向病原体的研究中，展现出卓越的灵敏度与特异性：针对沙眼衣原体（MOI<0.1）感染的 HEK293 细胞，在感染 24 h 后捕获到 8 种细菌蛋白的 9 个半胱氨酸位点，包括调控细菌 RB→EB 分化的关键蛋白 DksA、Euo，以及免疫靶点 OmpA；针对辛德毕斯病毒（SINV）感染，成功标记了病毒复制必需的非结构蛋白 nsP2（Cys723）和 nsP3（Cys288），其中 Cys288 位于保守的锌结合结构域，突变后会导致病毒无法复制，为抗病毒药物研发提供了精准靶点。此外，该试剂还能检测到低丰度的病毒剪接变体（如腺病毒 E1b 蛋白的 19k 和 55k 亚型），展现出超越传统方法的检测灵敏度。

1.8 电催化半胱氨酸交叉偶联反应

2025 年，Gao 课题组^[45]报道了一种电化学诱导的极性反转方法，成功实现肽中半胱氨酸的高效功能化修饰与环化反应，为多肽修饰提供了绿色高效的新路径。该方法以简单卤素源为基础，通过金属介导的卤素原子转移实现半胱氨酸的原位极性反转，无需贵金属催化剂、有毒活化试剂及复杂预处理，仅在温和条件下即可完成高选择性修饰。反应体系以 $\text{NiBr}_2 \cdot \text{diglyme}$ 为催化

剂、 $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$ 为电解质，在室温条件下，通过 C-S 交叉偶联实现反应（图 20）。

该方法底物适用性广，可实现多肽侧链半胱氨酸巯基在亮氨酸等脂肪族氨基酸、甲硫氨酸等敏感残基共存下的精准反应，兼容六肽至八肽等复杂肽段；偶联层面可高效结合多取代烯胺、唑类化合物及安替比林衍生物，还耐受叠氮、炔基生物正交基团，为多肽后续功能化留设反应位点。除分子间修饰外，还可通过分子内 S-H/C-H 交叉偶联合成 16~25 元环肽，覆盖催产素前体衍生环肽等多类序列，产率 28%~85%；含半胱氨酸与吡唑的多肽环化选择性优异，非优化条件下五六肽环化也可顺利进行，在环肽药物研发中价值突出。相较传统方法其兼具条件温和、环保易操作等优势，丰富了多肽修饰技术体系，为肽功能化、环肽制备提供新方案，也拓展了电化学在生物分子修饰领域的应用思路。

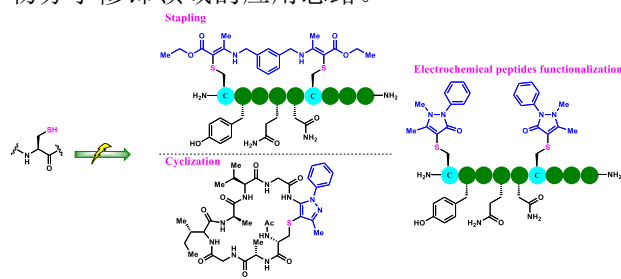


图 20 电催化介导的 C-H/S-H 交叉偶联反应^[45]

Fig.20 Electro-mediated C-H/S-H cross-coupling reaction^[45]

1.9 光催化修饰半胱氨酸的方法

2017 年，Noël 课题组^[46]提出了一种温和的可见光介导的半胱氨酸芳基化策略。该方法依赖于使用曙红 Y 作为无金属光催化剂和芳基重氮盐作为芳基化剂。该反应可以在微流反应器中显著加速，同时允许原位形成所需的芳基重氮盐。该研究报道的分批和流动方案可用于获得广泛系列的芳基化半胱氨酸衍生物和含有芳基化半胱氨酸的二肽。此外，该方法适用于在生物相容性反应条件（室温、磷酸盐缓冲盐水（PBS）缓冲液）下在短反应时间内对模型肽进行化学选择性芳基化（图 21）。

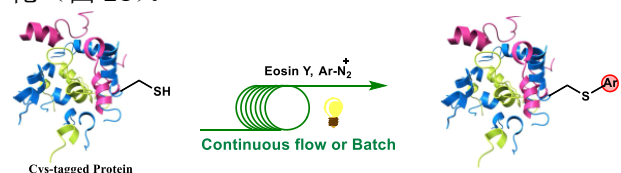


图 21 可见光介导的半胱氨酸选择性芳基化反应^[46]

Fig.21 Visible light-mediated selective arylation of cysteine^[46]

Tian 课题组^[47]开发了一种多功能且无需催化剂的平台，用于靶向半胱氨酸的生物偶联，该平台利用吡啶异氰酸酯在可见光诱导下的光反应。该方法可在温和条件下高效合成吡啶并联结构和吡啶螺环杂环结构。该反应底物范围广泛而高效，包括氨基酸、生物活性肽以及蛋白质，并

已成功应用于固相合成，显著提高了操作效率和可持续性。该平台的关键应用包括构建靶向 HER2 的生物素探针、合成结构多样的环状肽、组装 PROTAC 分子以及修饰模型蛋白。通过基于吲哚异氰酸酯的光探针进行化学蛋白质组学分析，在细胞裂解液中鉴定出多种半胱氨酸修饰位点，并对参与 RNA 剪接、翻译和微管组织的蛋白质进行了功能位点的定位。其中，特别值得关注的是对高价值治疗性靶标 PPP5C 中的 C77 进行的选择性修饰。分子对接模拟显示，探针位于 TPR 催化结构域的界面处，其异氰基团与 C77 硫醇的距离为 3.2 Å。该探针似乎作为分子内粘合剂发挥作用，通过广泛的疏水作用和氢键相互作用，稳定 PPP5C 的自抑制构象。这种机制通过别构抑制 PPP5C，而非直接作用于其活性位点，可能为这一具有挑战性的靶标提供更高的选择性。该工作在肽化学、蛋白质工程和药物开发中具有广泛的应用前景，也为开发针对传统难药靶蛋白的别构抑制剂开辟了新的途径。

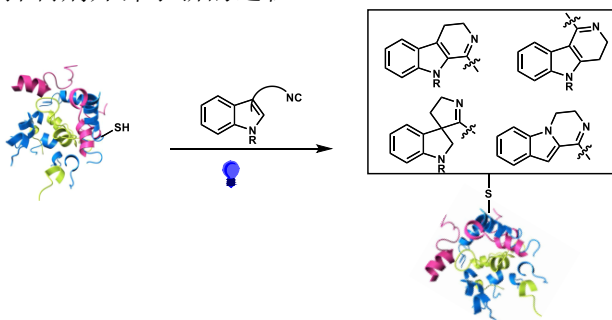


图 22 通过吲哚异氰酸酯光化学实现无催化剂的放射性半胱氨酸修饰^[47]

Fig.22 Catalyst-free divergent cysteine modification via indole isocyanate photochemistry^[47]

生物偶联反应对于在生物分子的天然环境中进行探针研究至关重要。光激活生物偶联可实现时空调控，但目前的方法存在诸多局限，例如需要非典型官能团、细胞毒性重金属催化剂以及高能量紫外或可见光 ($\lambda < 800 \text{ nm}$)，这些限制了组织穿透能力，并增加了光毒性风险^[48]。为此，Diao 课题组^[49]引入了 TagC-RED，一种基于二氮化物的反式-烯丙型共轭结构，通过红外光 ($\lambda > 1000 \text{ nm}$) 实现半胱氨酸特异性生物偶联。TagC-RED 具有定量性、快速性和无需催化剂的特点，且能深入组织，从而实现细胞内和体内的稳健标记。机制研究表明，TagC-RED 通过形成电子供体-受体 (EDA) 复合物而被激活，该复合物可接受红外照射并经历更高效的反式-烯丙反应。TagC-RED 在体内化学生物学及诊断创新方面展现出巨大潜力 (图 23)。

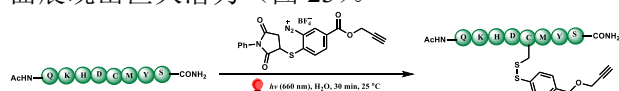


图 23 一种用于深层组织生物偶联的红外触发的逆向烯反应^[49]

Fig.23 An infrared-triggered retro-ene reaction for deep-tissue bioconjugation^[49]

1.10 半胱氨酸的硫-糖基化反应

S-糖基化作为天然 O-糖基化的稳定模拟变体，具有抗水解、抗酶解的优势，在药物研发和生物研究中需求迫切，但传统化学方法需预活化半胱氨酸 (如形成二硫键或硫卤键)，酶促方法则受限底物特异性，难以满足多样化需求^[50,51]。2021 年，Niu 课题组^[52]研究了一种立体选择性 S-糖基化反应，为多肽和蛋白质的半胱氨酸残基修饰提供了通用且高效的解决方案，填补了传统方法在生物相容性、操作简便性与立体选择性上的空白。该方法的核心创新在于使用烯丙基糖基砜作为糖基自由基前体，这类试剂稳定性极佳，室温下无需特殊防护即可储存超过一年，且能在水溶液中保持活性，解决了传统糖基亲电试剂在生物相容环境中易水解的难题 (图 234)。反应通过可见光光催化，在生物条件下进行，无需氧化剂或还原剂。产物均为高立体选择性的轴向 S-糖苷键，结构均一性好，抗水解和酶解能力突出，为后续的生物应用提供了稳定性保障。既适用于基础研究中简单肽的糖基化修饰，也能满足药物研发中复杂蛋白质 (如亲和体 Affibody) 的精准改造，为 S-糖肽、S-糖蛋白的规模化制备提供了全新工具，有望在化学、抗肿瘤疫苗开发、长效药物设计等领域广泛应用。

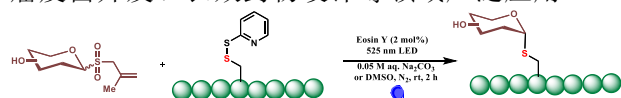


图 24 多肽和蛋白质的高立体选择性的硫-糖基化^[52]

Fig.24 Stereoselective S-glycosylation of peptides and proteins^[52]

1.11 半胱氨酸与全氟芳烃的亲电核取代修饰反应

2013 年，Pentelute 课题组^[53]报道了一种基于全氟芳烃-半胱氨酸芳香取代反应的新型环化策略，该反应可在室温下高效、高选择性地实现半胱氨酸残基的芳基化修饰，生成含刚性全氟芳烃桥连结构的环肽 (图 25a)，将该策略应用于靶向 HIV-1 衣壳组装蛋白 C 端结构域 (C-CA) 的肽序列时，环肽相比未环化肽的结合亲和力、细胞穿透性及蛋白水解稳定性上均显著增强；同时，该化学方法兼容天然化学连接 (NCL)，成功用于合成可结合人表皮生长因子 2 受体 (HER2) 的小蛋白亲和体，且不改变其整体拓扑结构与功能，为生物分子的修饰提供了新工具。复杂分子的靶向功能化是化学领域最具挑战性的问题之一。通常，需要借助保护基团或催化剂，才能在多个反应活性相似的位置中选择性地修饰某一特定位置，而能够精准调控目标位点周围局部化学环境的通用策略却十分罕见。2015 年，Pentelute 课题组^[54]在之前工作基础上提出了一种由 4 个氨基酸组成的序列 (Phe-Cys-Pro-Phe)，即“ π -夹具”，

该结构可调控半胱氨酸硫醇的反应活性, 实现与全氟芳香族试剂的靶向共轭(图 25b)。利用该 π -夹具对含有多个内源性半胱氨酸残基的蛋白质中的一个半胱氨酸位点进行选择性修饰。这些例子包括抗体和基于半胱氨酸的酶, 它们若采用传统的半胱氨酸修饰方法将难以实现选择性改造。通过 π -夹具修饰的抗体仍保留了对靶标分子的结合亲和力, 从而成功合成出特异性抗体-药物偶联物, 用于选择性杀伤 HER2 阳性乳腺癌细胞。 π -夹具为实现靶向化学提供了意想不到的新方法, 也为生物分子的科研与治疗应用开辟了新的途径。

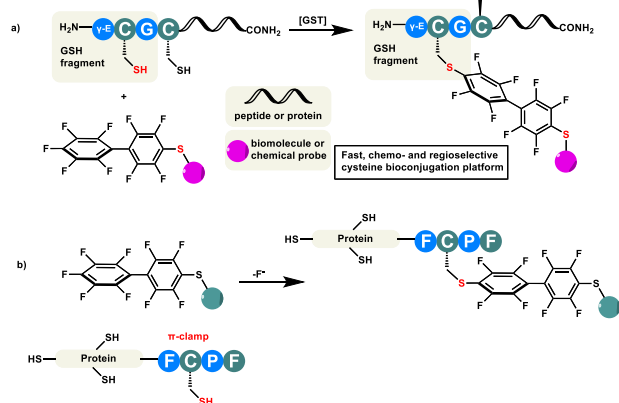


图 25 全氟芳香族分子与蛋白质半胱氨酸残基之间的 S_NAr 反应^[49, 50]

Fig.25 S_NAr reaction between perfluoroaromatic molecules and cysteine residues in proteins^[49, 50]

2 二硫键重桥联反应修饰半胱氨酸

二硫键重桥联依托巯基与二硫键的可逆交换实现新二硫键重构, 相比单硫醇修饰, 该方法偶联产物均一性更好、DAR 调控精度更高^[55]。ADC 理想 DAR 为 2~4, 过高易造成抗体聚集失稳, 过低则抗肿瘤活性不足。单硫醇还原修饰因游离巯基位点杂乱易导致偶联不均, 而二硫键交换可定点修复抗体链间二硫键, 将 DAR 精准锁定在 4.0, 加之其仅选择性还原部分二硫键、不扰动抗体整体空间结构, 可有效保全抗体活性, 大幅优化 ADC 药用价值^[2, 51]。

2.1 3-溴-5-亚甲基吡咯烷酮修饰半胱氨酸特异性蛋白质与二硫键连接

尽管已开发出多种针对半胱氨酸特异性蛋白质修饰的试剂, 但其中仅有少数能够实现单个半胱氨酸残基的多功能化以及二硫键桥接生物共轭。2020 年, Zhou 课题组^[56]报道了一类简单、稳定且多功能的试剂—3-溴-5-亚甲基吡咯烷酮 (3Br-5MPs), 用于半胱氨酸特异性蛋白质修饰。该化合物可通过一步温和反应轻松合成, 其标记效率与马来酰亚胺类试剂相当, 但半胱氨酸特异性更高。将半胱氨酸引入 3Br-5MPs 后可生成共轭物, 再通过其他硫醇或半胱氨酸进行二次连接, 因此 3Br-5MPs 在单个半胱氨酸的多功能化

及二硫键桥接生物共轭方面具有重要价值。标记反应及后续处理过程温和, 可制备出稳定且活性良好的蛋白质共轭物, 适用于生物应用 (图 26)。

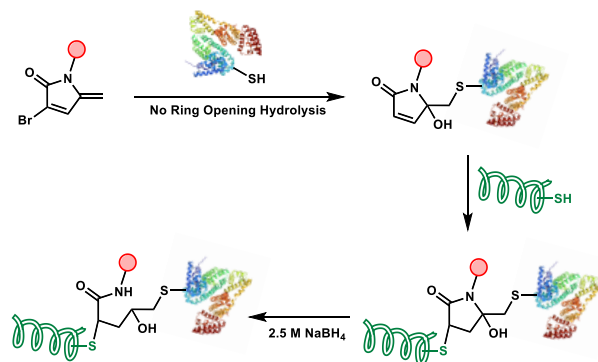


图 26 3-溴-5-亚甲基吡咯烷酮修饰半胱氨酸^[56]

Fig.26 Cysteine modification with 3-bromo-5-methylenepyrrolidinone^[56]

2.2 二氯苯乙酮酯衍生物修饰半胱氨酸特异性蛋白质与二硫键连接

2020 年, Luo 课题组^[57]发展了一类可用于多肽与抗体二硫键定点重桥联的生物偶联试剂——二氯苯乙酮衍生物。该试剂具备优异的巯基化学选择性, 仅特异性对半胱氨酸残基上的巯基 (-SH) 发生共价偶联, 可完全规避多肽、蛋白质骨架中普遍存在的氨基、羟基等亲核基团引发的非特异性副反应, 且能够优先与经还原活化的功能化巯基底物发生高效重桥联。在应用层面, 该偶联策略已成功实现兰瑞肽、N-乙酰催产素等上市药用多肽的二硫键重构; 通过在二氯苯乙酮骨架上预先引入异硫氰酸荧光素 (FITC) 荧光标签, 还可一步完成多肽位点特异性荧光标记。该温和、生物相容性良好的修饰体系, 为多肽定点化学修饰、均一性 ADC 的可控制备提供了简便高效的实用化工具 (图 27)。

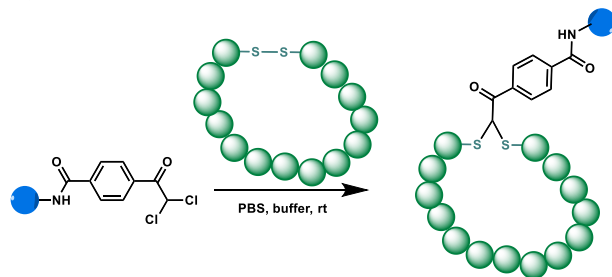


图 27 二氯苯乙酮衍生物修饰半胱氨酸^[57]

Fig.27 Cysteine modification with dichloroacetophenone derivatives^[57]

同年, 该课题组还设计了 2H-氮杂环丙烯-2-甲酰胺类化合物作为新型双功能巯基连接剂, 通过巯基加成-开环的级联过程原位生成氨基甲酰胺官能团, 该反应无需任何催化剂、在室温下即可进行, 且具有无金属、原子经济性高、位点选择性强的优势^[58]。该连接剂能在室温水溶液中实现含半胱氨酸多肽的高效修饰, 单半胱氨酸多肽会形成二聚体硫代乙缩醛, 双半胱氨酸多肽则生成环化硫代乙缩醛桥接产物, 且兼容多肽中的多

种氨基酸残基（图 28）。

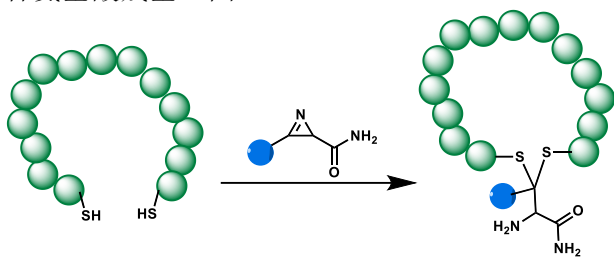


图 28 2H-氮杂环丙烯-2-甲酰胺类化合物修饰半胱氨酸^[58]

Fig.28 Cysteine modification with 2H-azirine-2-carboxamides^[58]

2.3 炔基化合物修饰半胱氨酸特异性蛋白质与二硫键连接

在芳基二丙炔腈（3-芳基丙炔腈）的基础研究基础上^[27]，Wagner 及其合作者^[59]通过在苯环的对位引入第二个丙炔腈官能团，成功设计出一种新型的二硫键重桥连接体，从而构建了 ADPN 分子（图 29）。在与曲妥珠单抗反应的邻位、对位和间位 ADPN 异构体研究中，仅对位 ADPN 在反应 12 h 后未检测到游离的轻链或重链片段。基于这些发现，该研究选择了对位 ADPN 用于新 ADC 的制备。他们合成了两种 ADC：一种由曲妥珠单抗（T）、ADPN、半乳糖苷（Gal）和单甲基奥瑞斯坦 E（MMAE）组成，另一种则额外添加了一个短 PEG 连接臂（PEG4）。在特定反应条件下，所得 ADC 表现出较高的 DAR。体外细胞毒性实验表明，这些新型 ADC 对 HER2 阳性癌细胞具有较强活性，且对 HER2 阴性癌细胞的毒性高于 FDA 批准的 T-DM1。

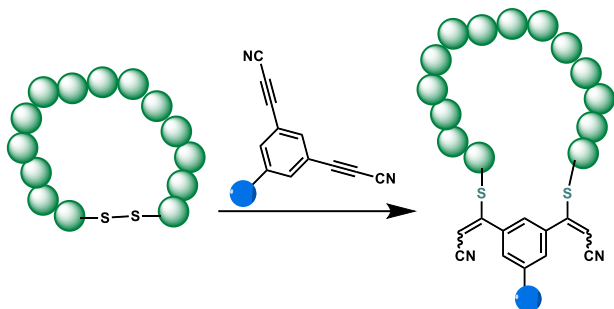


图 29 ADPN 分子化合物修饰半胱氨酸^[59]

Fig.29 Cysteine modification with ADPN molecules^[59]

硫醇-炔点击化学是一类应用于材料领域的新型点击反应，可通过紫外诱导自由基加成或硫醇对活化炔烃的亲核加成两条途径进行。2015 年 Griebenow 课题组^[60]报道了炔烃插入二硫键的重桥联技术，经 TCEP 还原二硫键后，在 V （水）： V （甲醇）=1:1 体系、365 nm LED 与 LAP 引发下进行光促硫醇-炔偶联，目标硫醚产物分离产率 49%，为 1:1 非对映异构体混合物。该体系已用于特利加压素（terlipressin）和加压素酸（pressinoic acid）两种单二硫键多肽的环重构，LC/MS 证实反应为先硫醇对炔烃单加成、再分子内硫醇-烯环化的两步串联机理（图 30）。将该

策略拓展至 Fab 片段 M14-G07 修饰时，需 4 h 反应时长并每小时补加 LAP，且蛋白浓度需不低于 46.1 mg/mL 方可保证偶联效果；但该方法目前仍无法实现完整全长抗体的二硫键重桥联，在均质 ADC 制备中存在应用短板。

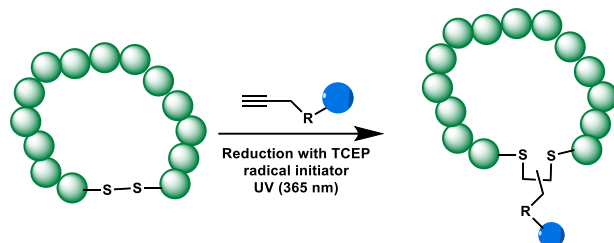


图 30 紫外 LED 间歇式光化学反应器在硫醇-炔点击反应中的应用^[60]

Fig.30 Application of UV LED batch photoreactor in thiol-yne click reaction^[60]

两种硫醇的直接交叉耦合是点击化学中一个有吸引力的仿生概念，但会导致同源和异源二聚体的统计混合。在 2025 年，Winne 课题组^[61]报道了一类新型硫醇选择性点击化学反应试剂——溴-烯酮，第一代和第二代硫醇加成在这些试剂上的动力学区分，便于在水溶液中实现两种不同硫醇的一罐式交叉点击，无需中间分离或纯化。这两种硫醇通过一个碳原子连接，模拟二硫键桥。溴-烯酮可用于合成各种交联硫醇结构，包括小分子药物、荧光团、碳水化合物、肽和蛋白质，其中包括蛋白质-蛋白质杂二聚体的例子。所得加合物在生理条件下具有稳定性，通过合理选择溴酮试剂，即使存在过量游离硫醇，加合物也能保持稳定（图 31）。

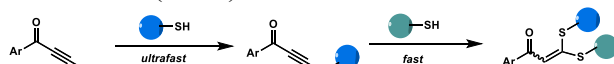


图 31 溴烯酮作为硫醇-硫醇交叉偶联反应试剂^[61]

Fig.31 Bromoenone as a reagent for thiol-thiol cross-coupling reactions^[61]

2021 年，Hackenberger 课题组^[62]报道了一种基于双反应性不饱和膦酸酯（PV）化合物的新技术，用于选择性蛋白质标记和二硫键重桥接。二乙基膦酸酯基团在水相体系中对巯基表现出优异的反应活性和选择性，从而可轻松、模块化地生成含复杂分子的蛋白质偶联物。此外，所得构建体在人体血清及活细胞内存在过量小分子硫醇时仍表现出卓越的稳定性。利用二乙基膦酸酯重桥接的抗体可成功修饰上荧光团，获得高达 4 倍的荧光强度（FAR），并保持其靶标选择性。这种简单直接的半胱氨酸选择性蛋白质与抗体修饰策略，将有助于开发适用于生物和生物制药领域的新型工具（图 32）。

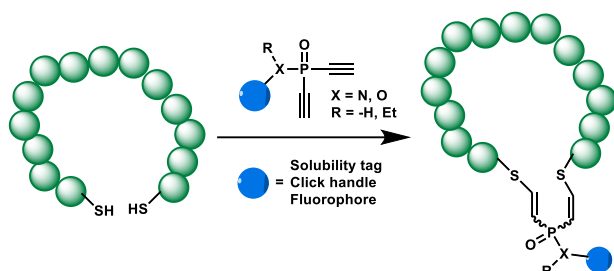


图 32 二乙基磷酸酯用于半胱氨酸选择性蛋白质标记和二硫键重桥接^[62]

Fig.32 Diethyl phosphonate for cysteine-selective protein labeling and disulfide rebridging^[62]

2.4 氯氧亚胺试剂对肽、蛋白质和噬菌体的特异性半胱氨酸修饰

在 2023 年,高建民课题组^[63]采用氯氧亚胺试剂实现对半胱氨酸残基的特异性修饰,为拓展应用又设计合成新型双氯氧亚胺试剂,实现天然肽和蛋白质中 Cys-Cys 二硫键的高效穿插连接,基于该技术,团队成功将其应用于噬菌体工程,构建了化学修饰的噬菌体展示文库(图 33)。

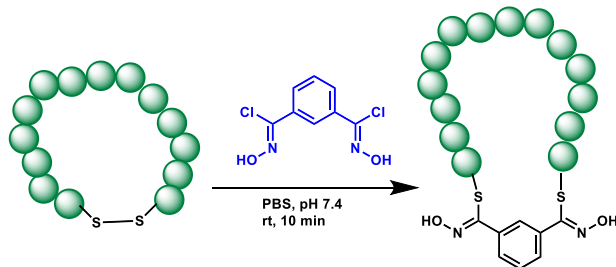


图 33 氯氧亚胺试剂修饰半胱氨酸^[63]

Fig.33 Cysteine modification with chloroxime reagents^[63]

2.5 天然二硫键上引入氧杂环丁烷

在 2017 年, Bernardes 课题组^[64]报道了一种高效的方法,在温和且生物相容的水溶液条件下,对肽和蛋白质中以天然二硫键形式存在的半胱氨酸残基进行氧杂环烷基化固定。四元氧杂环丁烷环具有理想的间距,可直接将天然二硫键固定在多种蛋白质支架上,包括抗体。然而,该方法依赖于目标蛋白内二硫键的溶剂可及性。此外,与现有方法不同,该方法无需预先进行序列工程,也无需在二硫键还原步骤后进行纯化。通过选择性地引入氧杂环烷基团,可稳定折叠结构,从而获得具有增强生物活性、在生物条件下稳定的二硫键接合产物。作者通过区域选择性地对载体蛋白 CRM197 进行二硫键固定,证明了氧杂环烷基接枝技术在蛋白质上的应用价值,该方法显著提高了其体内免疫原性。由于许多治疗性蛋白含有以二硫键形式存在的半胱氨酸残基,作者预计通过氧杂环烷基接枝可直接调控其结构,这在原则上可作为一种通用策略,用于增强其体内稳定性,并优化其结构以实现最佳的药代动力学和活性(图 34)。

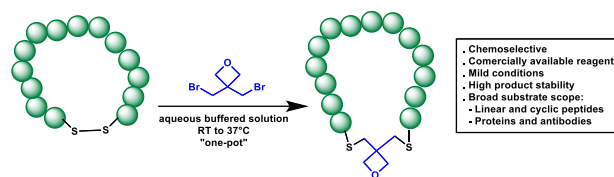


图 34 氧杂环丁烷衍生物修饰半胱氨酸^[64]

Fig.34 Cysteine modification with oxetane derivatives^[64]

3 结论

蛋白质化学修饰是生物医药领域的关键技术,半胱氨酸硫基因独特的亲核反应活性与氧化还原可逆特性,加之在蛋白质中丰度低、位点保守性强,是实现蛋白质高精度、可控共价偶联的理想修饰位点。本文系统总结了天然半胱氨酸两类主流化学修饰技术体系,包括游离单巯基官能化与二硫键还原重桥联反应,梳理了各类偶联方法的反应特征、优劣差异及生物医药应用现状。

游离单巯基官能化技术反应条件温和、适用性广,是多肽、抗体及功能蛋白修饰的常用手段。经典的马来酰亚胺偶联工艺成熟,但存在体内稳定性不足、易发生逆反应脱偶联等缺陷。近年来发展的炔基化修饰、不饱和羰基加成、硅基功能化偶联、金属催化芳基化及电化学修饰等新型策略,有效提升了反应选择性与产物稳定性,降低了生物毒性,大幅拓展了单巯基修饰的应用范围。

二硫键重桥联反应修饰可精准调控 ADC 药物 DAR 值,产物均一性好,能够最大限度保留抗体结构与生物活性,并可依托肿瘤微环境实现药物可控释放,在高端均一型抗体偶联药物制备中优势突出。但该技术仍存在易产生半抗体副产物、连接子合成复杂、有效转化率有限等问题,限制了规模化应用。

现阶段半胱氨酸偶联技术仍普遍存在试剂水溶性不足、综合性能难以兼顾、工艺标准化欠缺等瓶颈。未来研究需聚焦高稳定、高兼容、低成本的新型巯基选择性偶联试剂开发,优化二硫键重桥联技术工艺与产物控制策略,完善绿色水相偶联体系,推动半胱氨酸偶联修饰技术在靶向药物、生物探针、功能蛋白工程等领域的进一步产业化应用。

参考文献:

- [1] Barber K W, Rinehart J. *Nat. Chem. Biol.*, 2018, **14**(3): 188-192.
- [2] Kang M S, Kong T W S, Khoo J Y X, Loh T P. *Chem. Sci.*, 2021, **12**(41): 13613-13647.
- [3] Wu D, Sedgwick A C, Gunnlaugsson T, Akkaya E U, Yoon J, James T D. *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**(23): 7105-7123.
- [4] Witus L S, Francis M B. *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**(9): 774-783.
- [5] Hussain A, Grimm A, Sheng W J, Zhang C Y, Al-Rawe M, Bräutigam K, Abu Mraheil M, Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(4): 343.
- [6] Hallenbeck K, Turner D, Renslo A, Arkin M. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2016, **17**(1): 4-15.

- [7] Fodje M N, Al-Karadaghi S. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2002, **15**(5): 353-358.
- [8] Paulsen C E, Carroll K S. *Chem. Rev.*, 2013, **113**(7): 4633-4679.
- [9] Giles N M, Watts A B, Giles G I, Fry F H, Littlechild J A, Jacob C. *Chem. Biol.*, 2003, **10**(8): 677-693.
- [10] Schulz A, Adermann K, Eulitz M, Feller S M, Kardinal C. *Tetrahedron*, 2000, **56**(24): 3889-3891.
- [11] Dasari M, Acharya A P, Kim D, Lee S, Lee S, Rhea J, Molinaro R, Murthy N. *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**(1): 4-8.
- [12] Kim T, Jeon H M, Le H T, Kim T W, Kang C, Kim J S. *Chem. Commun.*, 2014, **50**(57): 7690.
- [13] Adair J R, Howard P W, Hartley J A, Williams D G, Chester K A. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012, **12**(9): 1191-1206.
- [14] Jain N, Smith S W, Ghone S, Tomczuk B. *Pharm. Res.*, 2015, **32**(11): 3526-3540.
- [15] Walsh S J, Bargh J D, Dannheim F M, Hanby A R, Seki H, Counsell A J, Ou X X, Fowler E, Ashman N, Takada Y, Isidro-Llobet A, Parker J S, Carroll J S, Spring D R. *Chem. Soc. Rev.*, 2021, **50**(2): 1305-1353.
- [16] Zhao L L, Zhu Y Q, Li P, Zhu Z S, Liu Z. *Chin. J. Pharm.*, 2025, **56**(10): 1243-1251.
- 赵丽丽, 朱玉强, 李朋, 朱中松, 刘忠. *中国医药工业杂志*, 2025, **56**(10): 1243-1251.
- [17] Yu C F, Wang W B, Zhang F, Liu C Y, Li M, Chen W, Guo S, Wang L, Gao K. *Chin. J. New Drugs*, 2015, **24**(20): 2336-2340.
- 于传飞, 王文波, 张峰, 刘春雨, 李萌, 陈伟, 郭莎, 王兰, 高凯. *中国新药杂志*, 2015, **24**(20): 2336-2340.
- [18] 陈晓丽, 方红明. *养生科学*, 2026, **13**(1): 272-273.
- [19] Alley S C, Benjamin D R, Jeffrey S C, Okeley N M, Meyer D L, Sanderson R J, Senter P D. *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**(3): 759-765.
- [20] Shen B Q, Xu K Y, Liu L N, Raab H, Bhakta S, Kenrick M, Parsons-Reponte K L, Tien J, Yu S F, Mai E, Li D W, Tibbitts J, Baudys J, Saad O M, Scales S J, McDonald P J, Hass P E, Eigenbrot C, Nguyen T, Solis W A, Fuji R N, Flagella K M, Patel D, Spencer S D, Khawli L A, Ebens A, Wong W L, Vandlen R, Kaur S, Sliwkowski M X, Scheller R H, Polakis P, Junutula J R. *Nat. Biotechnol.*, 2012, **30**(2): 184-189.
- [21] Zhang Y Q, Zhou X P, Xie Y H, Greenberg M M, Xi Z, Zhou C Z. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**(17): 6146-6151.
- [22] Huang W M, Wu X, Gao X, Yu Y F, Lei H, Zhu Z S, Shi Y, Chen Y L, Qin M, Wang W, Cao Y. *Nat. Chem.*, 2019, **11**(4): 310-319.
- [23] Frei R, Waser J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**(26): 9620-9623.
- [24] Abegg D, Frei R, Cerato L, Prasad Hari D, Wang C, Waser J, Adibekian A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**(37): 10852-10857.
- [25] Tessier R, Ceballos J, Guidotti N, Simonet-Davin R, Fierz B, Waser J. *Chem*, 2019, **5**(8): 2243-2263.
- [26] Koniev O, Leriche G, Nothisen M, Remy J S, Strub J M, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselaer A, Baati R, Wagner A. *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**(2): 202-206.
- [27] Kolodych S, Koniev O, Baatarkhuu Z, Bonnefoy J Y, Debaene F, Cianfèrani S, Van Dorsselaer A, Wagner A. *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**(2): 197-200.
- [28] Teng S H, Zhang Z G, Li B H, Li L Y, Tan M C L, Jia Z H, Loh T P. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, **62**(45): e202311906.
- [29] Petit E, Bosch L, Costa A M, Vilarrasa J. *J. Org. Chem.*, 2019, **84**(17): 11170-11176.
- [30] Wang C L, Zhao Z G, Ghadir R, Yang D C, Zhang Z J, Ding Z, Cao Y, Li Y Q, Fassler R, Reichmann D, Zhang Y J, Zhao Y L, Liu C, Bi X B, Metanis N, Zhao J F. *ACS Cent. Sci.*, 2024, **10**(9): 1742-1754.
- [31] Bernardim B, Cal P M S D, Matos M J, Oliveira B L, Martínez-Sáez N, Albuquerque I S, Perkins E, Corzana F, Burtoloso A C B, Jiménez-Osés G, Bernardes G J L. *Nat. Commun.*, 2016, **7**(1): 13128.
- [32] Ariyasu S, Hayashi H, Xing B G, Chiba S. *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**(4): 897-902.
- [33] Istrate A, Geeson M B, Navo C D, Sousa B B, Marques M C, Taylor R J, Journeaux T, Oehler S R, Mortensen M R, Deery M J, Bond A D, Corzana F, Jiménez-Osés G, Bernardes G J L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, **144**(23): 10396-10406.
- [34] Zhang Z G, Li L Y, Xu H L, Lee C K, Jia Z H, Loh T P. *J. Am. Chem. Soc.*, 2024, **146**(3): 1776-1782.
- [35] Zuo Q, Li Y, Lai X, Bao G, Chen L, He Z, Song X, E R, Wang P, Shi Y, Luo H, Sun W, Wang R. *Adv. Sci.*, 2024, **11**(21): e2308491.
- [36] Bargh J D, Isidro-Llobet A, Parker J S, Spring D R. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, **48**(16): 4361-4374.
- [37] Maruyama K, Ishiyama T, Seki Y, Sakai K, Togo T, Oisaki K, Kanai M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**(47): 19844-19855.
- [38] Wan C, Zhang Y C, Wang J P, Xing Y, Yang D, Luo Q, Liu J, Ye Y, Liu Z, Yin F, Wang R, Li Z. *J. Am. Chem. Soc.*, 2024, **146**(4): 2624-2633.
- [39] Dang X, Zhang C, Shang J, Zhao Z, Wang C, Xu Z. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2026 Jul 8: e2386230.
- [40] Baig M H, Ahmad K, Saeed M, Alharbi A M, Barreto G E, Ashraf G M, Choi I. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, **103**: 574-581.
- [41] Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S Y, Teng L S, Lee R J, Yang Z G. *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**: 697.
- [42] Shen L H, Monasson O, Peroni E, Le Bideau F, Messaoudi S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, **62**(50): e202315748.
- [43] Bacauanu V, Merz Z N, Hua Z L, Lang S B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2023, **145**(47): 25842-25849.
- [44] Fu X P, Liu W B, Demyanenko Y, Kamel W, Ravi R T, Ruscica V, Noerenberg M, Yin X J, Jiang Y, Fan C H, Kowalczyk K M, Kitano E, Morgan J, Aldridge S, Dumoux M, Castello A, Mohammed S, Davis B G. *Nat. Chem.*, 2026, **18**(3): 457-472.
- [45] Xiang F, Deng J, Bu X T, Zhou Y J, Zhang J R, Weng Y, Gao M. *Nat. Commun.*, 2025, **16**(1): 9617.
- [46] Bottecchia C, Rubens M, Gunnos S B, Hessel V, Madder A, Noël T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**(41): 12702-12707.
- [47] Wei H, Zhu G H, Zhu R Y, Miao R Y, Lu X Y, Cheng W Y, Tian X. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2026, **65**(24): e24506.
- [48] Ai X Z, Mu J, Xing B G. *Theranostics*, 2016, **6**(13): 2439-2457.
- [49] Suh S M, Ben-Zvi B, Talbott J M, Manoj N, Nelson B M, Hughes R R, Haug G C, Koide S, Paton R S, Raj M, Diao T N. *J. Am. Chem. Soc.*, 2026, **148**(19): 19738-19749.
- [50] De Leon C A, Levine P M, Craven T W, Pratt M R. *Biochemistry*, 2017, **56**(27): 3507-3517.
- [51] Companon I, Guerreiro A, Mangini V, Castro-López J, Escudero-Casao M, Avenzoza A, Busto J H, Castellón S, Jiménez-Barbero J, Asensio J L, Jiménez-Osés G, Boutureira O, Peregrina J M, Hurtado-Guerrero R, Fiammengo R, Bernardes G J L, Corzana F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**(9): 4063-4072.
- [52] Wan L Q, Zhang X, Zou Y K, Shi R, Cao J G, Xu S Y, Deng L F, Zhou L, Gong Y Q, Shu X L, Lee G Y, Ren H Y, Dai L Z, Qi S Q, Houk K N, Niu D W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**(31): 11919-11926.
- [53] Zhang C, Spokoiny A M, Zou Y K, Simon M D, Pentelute B L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**(52): 14001-14005.

-
- [54] Zhang C, Welborn M, Zhu T Y, Yang N J, Santos M S, Van Voorhis T, Pentelute B L. *Nat. Chem.*, 2016, **8**(2): 120-128.
- [55] Lei Y X, Zheng M L, Chen P, Seng Ng C, Peng Loh T, Liu H T. *ChemMedChem*, 2025, **20**(15): e202500262.
- [56] Zhang Y Q, Zang C L, An G C, Shang M D, Cui Z H, Chen G, Xi Z, Zhou C Z. *Nat. Commun.*, 2020, **11**(1): 1015.
- [57] Wu L H, Zhou S G, Luo Q F, Tian J S, Loh T P. *Org. Lett.*, 2020, **22**(21): 8193-8197.
- [58] Chen Y, Yang W J, Wu J M, Sun W B, Loh T P, Jiang Y J. *Org. Lett.*, 2020, **22**(5): 2038-2043.
- [59] Koniev O, Dovgan I, Renoux B, Ehkirch A, Eberova J, Cianfèrari S, Kolodych S, Papot S, Wagner A. *MedChemComm*, 2018, **9**(5): 827-830.
- [60] Griebenow N, Bräse S, Dilmac A M. *RSC Adv.*, 2015, **5**(67): 54301-54303.
- [61] Nicque M, Meffert J H, Maes D, Bevernaege K, Iftikhar M, Zwaenepoel O, Gettemans J, Madder A, Winne J M. *Nat. Commun.*, 2025, **16**(1): 6386.
- [62] Stieger C E, Franz L, Körlin F, Hackenberger C P R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, **60**(28): 15359-15364.
- [63] Chen F J, Zheng M M, Nobile V, Gao J M. *Chem.*, 2022, **28**(20): e202200058.
- [64] Martínez-sáez N, Sun S, Oldrini D, Sormanni P, Boutureira O, Carboni F, Compañón I, Deery M J, Vendruscolo M, Corzana F, Adamo R, Bernardes G J L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**(47): 14963-14967.
