

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-017

基于P450选择性氧化的天然产物化学-酶法合成进展

程中玉, 李付璋

(复旦大学药学院, 天然药物学系, 上海 201203)

摘要: 随着基因挖掘、生物信息学、酶工程等多学科的交叉融合与协同创新, 将绿色高效的酶催化反应与现代有机合成方法相结合的化学-酶法合成策略逐渐发展成为合成活性天然产物、药物分子和其他具有重要价值的有机分子的有力工具。其中细胞色素单加氧酶P450能够选择性地实现惰性C-H氧化这一经典的挑战性化学转化, 为活性天然产物的高效合成提供了新的思路, 成为合成科学领域的研究热点之一。本文以结构类型进行分类, 综述了P450选择性氧化在甾体、萜类以及其他类型天然产物化学-酶法合成中的应用进展, 并分析了相应的酶催化反应在提高目标产物合成效率方面起到的关键作用。此外, 还讨论了该领域目前所面临的挑战, 例如主要集中在对酶天然功能的利用, 并缺乏对反应位点的准确预测等; 同时从酶资源挖掘、酶的改造等多个角度出发展望了未来能够为这些挑战提供解决方案的研究方向和新兴技术, 包括高通量筛选技术、AI辅助酶工程等等。

关键词: 天然产物合成; 化学-酶法合成; P450单加氧酶; C-H键官能化; 化学选择性

中图分类号: Q629 文献标志码: A

Recent advances in chemoenzymatic synthesis of natural products *via* site-selective P450 oxidation

CHENG Zhongyu, LI Fuzhuo

(Department of Natural Medicine, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: Although bioactive natural products have played significant roles in pharmaceutical research, their application potential is still limited by low isolated yields and structural modification challenges. To overcome these obstacles, developing environmentally friendly and highly efficient synthetic strategies offers exceptional approaches to obtain complex bioactive natural products and their analogs. Driven by advancements in microbial genetics and enzyme engineering, chemoenzymatic strategies, which merge enzymatic and synthetic transformations, are steadily emerging as potent tools in the synthesis of bioactive natural products, pharmaceutical components and other valuable molecules. These fashionable strategies offer not only advantages of chemical synthesis, such as simplicity, flexibility and scalability, but also those of biosynthesis, including environmental friendliness, high selectivity and efficiency.

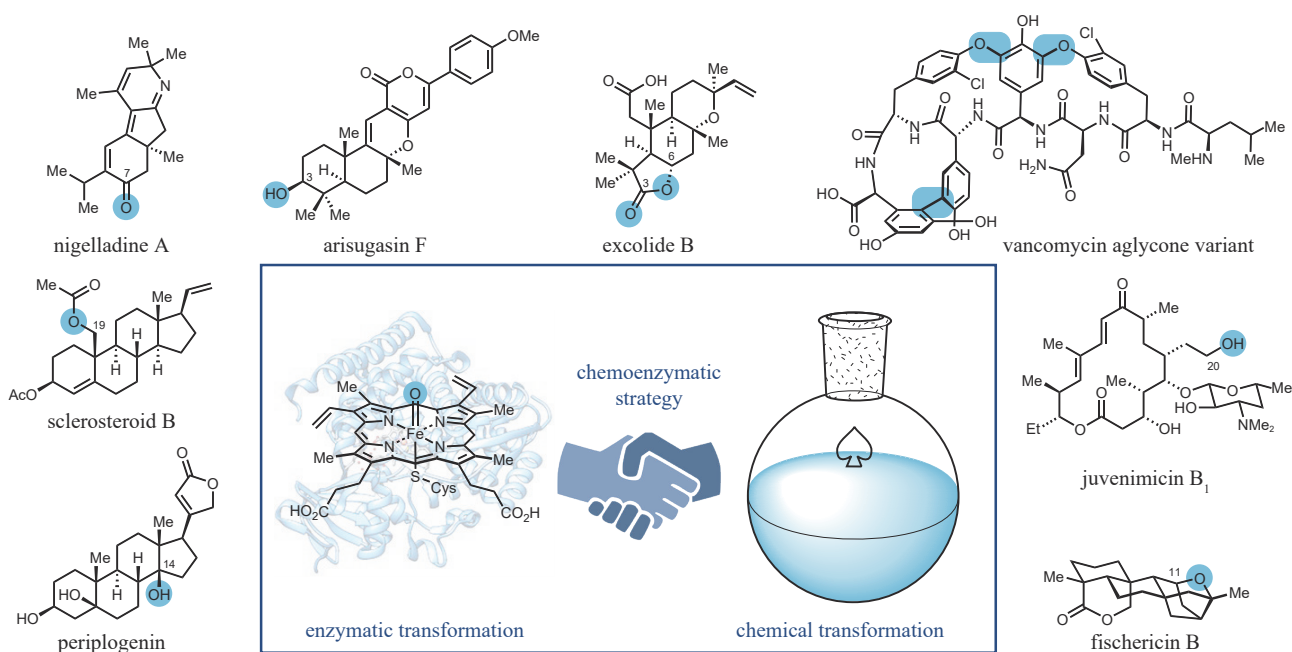
收稿日期: 2024-02-04 修回日期: 2024-05-21

基金项目: 国家自然科学基金 (22301041); 上海市自然科学基金 (23ZR1412900)

引用本文: 程中玉, 李付璋. 基于P450选择性氧化的天然产物化学-酶法合成进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 960-980

Citation: CHENG Zhongyu, LI Fuzhuo. Recent advances in chemoenzymatic synthesis of natural products *via* site-selective P450 oxidation [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 960-980

This will establish a linkage into the next-generation synthesis which is expected to break the boundary between chemistry and biology. Versatile cytochrome monooxygenases, P450s, can achieve inert C—H bond selective oxidation in mild and green conditions, a classically challenging organic transformation, providing novel retrosynthetic plans for complex natural products and becoming one of the hotspots in synthetic science. This review summarizes the recent applications of chemoenzymatic synthesis of natural products using P450-catalyzed site-selective oxidations as critical steps to improve the synthetic efficiency and avoid unnecessary functional group transformations and protection/deprotection steps, categorizing the case studies by structure features, such as steroids, terpenoids, and other types of natural products. At the end of this review, the current challenges in this field, such as heavily relying on the native activities of enzymes, are also analyzed and discussed, along with emerging research directions and technologies in new enzyme mining and enzyme engineering that may provide solutions to these challenges in the future. With constantly cross fusion of biosynthesis, chemical synthesis, synthetic biology, protein engineering, machine learning and other research field, P450-catalyzed site-selective oxidations will be becoming routine tools for synthetic chemists.



Keywords: natural product synthesis; chemoenzymatic synthesis; P450 monooxygenase; C—H bond functionalization; chemo-selectivity

天然产物骨架多样、结构丰富、活性出色，是药物发现的重要来源^[1]。但由于分离提取的收率低、重现性差以及后期结构修饰困难，无法可持续且经济可行地为后续深入的药物化学研究提供充足的物质基础，严重制约了基于天然产物的药物研发工作。为了突破这一研究瓶颈，利用新技术和新方法围绕高效、经济、规模的目标^[2-3]开发合成策略，快速实现具有显著生物活性的天然产物及其类似物的多样性合成显得尤为重要^[4]。

近年来，随着基因挖掘、生物信息学、酶工程等学科的交叉融合与协同创新，将绿色高效的酶催化反应与现代有机合成方法相结合的化学-酶法合成策略正逐渐发展成为合成活性天然产物、药物分子以及其他具有重要价值的有机分子的有力工具^[5-7]。化学-酶法策略能够有效地将酶催化成本低廉、绿色高效、条件温和、选择性好的优势和传统有机合成方法底物普适性强、容易实现多样性合成的特点相结合，使得二者取长补短、优

势互补，从而解决了传统合成路线中的关键难题，提高目标产物的合成效率。

选择性的惰性C—H键直接氧化便是经典合成化学中的挑战性转化之一，近年来不断涌现的C—H键活化方法能够部分解决这一挑战。但由于目标分子结构复杂且含有很多化学性质相似的C—H键，该策略在天然产物合成中的应用还值得深入探究^[8-9]。而生物代谢中很多重要的氧化酶，如细胞色素P450单加氧酶、黄素依赖型单加氧酶、铁/ α -酮戊二酸加氧酶以及非特异性过氧化酶等能够以专一的区域和立体选择性实现底物的选择性氧化，并且避免定位基团和保护基团的参与以及其他不必要的“非结构性”转化，与现有的化学方法形成良好的补充^[10]。除此之外，定向进化等酶工程手段可以在催化效率的提升、催化剂稳定性的优化和反应底物的拓展等方面提供帮助，为酶催化

反应的开发带来独特的优势^[11-12]。

其中，细胞色素P450单加氧酶（cytochrome P450 monooxygenases）是一类含有B型血红素（heme B）的蛋白超家族。其特征在于血红素辅因子的铁中心和蛋白中的半胱氨酸残基轴向连接，在电子供体Fe/S簇蛋白的帮助下生成Fe(II)—O₂复合物，并通过后续电子传递得到Fe(IV)=O卟啉阳离子自由基^[13]。这一高价铁氧物种可作为强氧化剂很容易地从结合的底物分子中的惰性sp³碳原子上夺取一个氢原子，产生相应的底物碳自由基，并通过快速的“氧回补”实现羟基化（图1）。除了羟基化之外，P450催化剂具有广泛的活性，能够在温和的条件下催化环氧化、C—C键氧化偶联、C—C键氧化断裂、氧化脱烷基化等多种不同类型的选择性氧化反应^[14-15]。这些高效的转化能够为目标产物的合成设计提供新的思路，不仅被广泛应

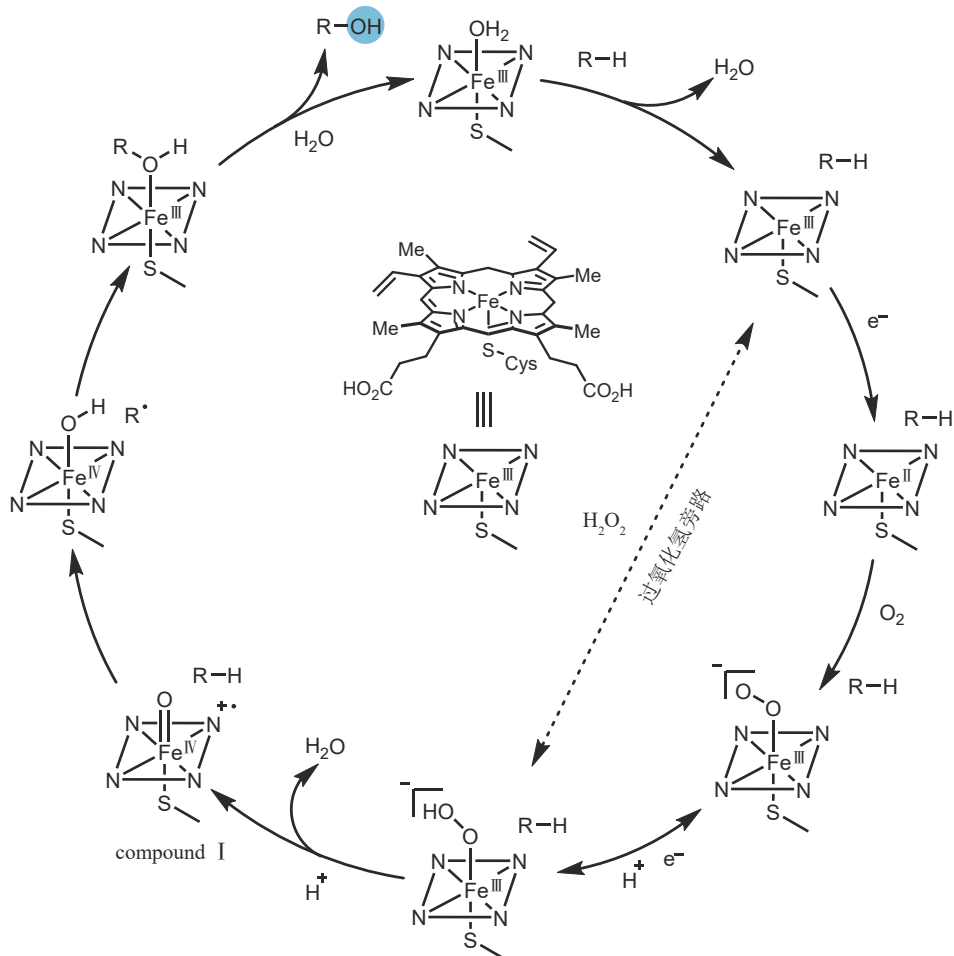


图1 细胞色素P450单加氧酶的催化循环

Fig. 1 Catalytic cycle of cytochrome P450 monooxygenases

用于香料、维生素、杀虫剂和药物分子的生产中，也成为了复杂天然产物合成^[10]与结构修饰^[16]的有力工具。本综述将以天然产物的类型进行分类，讨论P450酶在天然产物化学-酶法合成中的应用。

1 P450 选择性氧化在甾体化学-酶法合成中的应用

甾体类药物因其优异的生物活性，如抗感染、抗炎、抗过敏和抗肿瘤活性等，已成为仅次于抗生素的第二大类药物，预计2025年全球市值将超过170亿美元^[17]。而P450介导的惰性C—H键羟基化是一类对甾体药物非常重要的转化，其出色的区域和立体选择性不仅使这类反应能够用于甾体药物的合成、后期修饰及其代谢模拟，也能够作为“化学抓手”为其他结构复杂的甾体药物提供高效的半合成方案^[18-19]。

1.1 stereosteroids 的化学-酶法合成

甾体的C19位羟基化是雄性激素向雌性激素转化的关键步骤，在经典化学中通常需要以Norrisch反应^[20-21]、Barton光裂解^[22]以及Suárez反应^[23]为关键步骤实现。然而这些化学转化往往反应条件苛刻，并需要定位基团的参与，导致了底物范围窄、反应步骤冗长等缺点，制约了后续的生物学和药效学研究。而在生物转化中，一些*Pellicularia*

属的丝状真菌能够直接实现皮质酮类结构C19位甲基的选择性羟基化^[24]。受此启发，周强辉与瞿旭东课题组^[25]在2019年合作报道了stereosteroid B等6种C19羟基化的甾体的高效合成（图2）。

首先，作者通过对瓜亡革菌（*Thanatephorus cucumeris* NBRC 6298）中的P450酶进行挖掘，确定了可作用于可托多松（cortisolone, **1a**）C19位的目标酶TCP450-1。但鉴于该酶异源表达的效率较低，在进行规模制备时依然基于瓜亡革菌的全细胞生物转化进行优化。以*N,N*-二甲基甲酰胺（DMF）为共溶剂，当使用乙酰基保护C17位羟基并增加Fe²⁺浓度时，能够将反应转化率提高4倍，规模制备5 g羟基化产物**2**，使得该反应具备活性天然产物合成的应用价值。**2**通过二醇的氧化断裂能够“一锅法”转化为C19-羟雄烯二酮（**3**），再经由2~4步反应便可转化成炔诺酮（norethisterone, **4**）等10多种C19-去甲甾体药物的前体。除此之外，**2**经过TMSI选择性脱除C17位羟基可转化为高级中间体**5**，并通过多步转化完成C17位侧链的氧化切断和重构，实现了stereosteroid A（**6**）、ceratosteroid D（**7**）、sclerosteroid A（**8**）等6个C19羟基化甾体的合成，并修正了sclerosteroid B（**11**）的化学结构。

1.2 bufotalin 等强心苷的化学-酶法合成

强心苷是一类广泛分布于自然界中的甾体天然产物，除了被用作强心剂^[26]之外，还具有抗肿

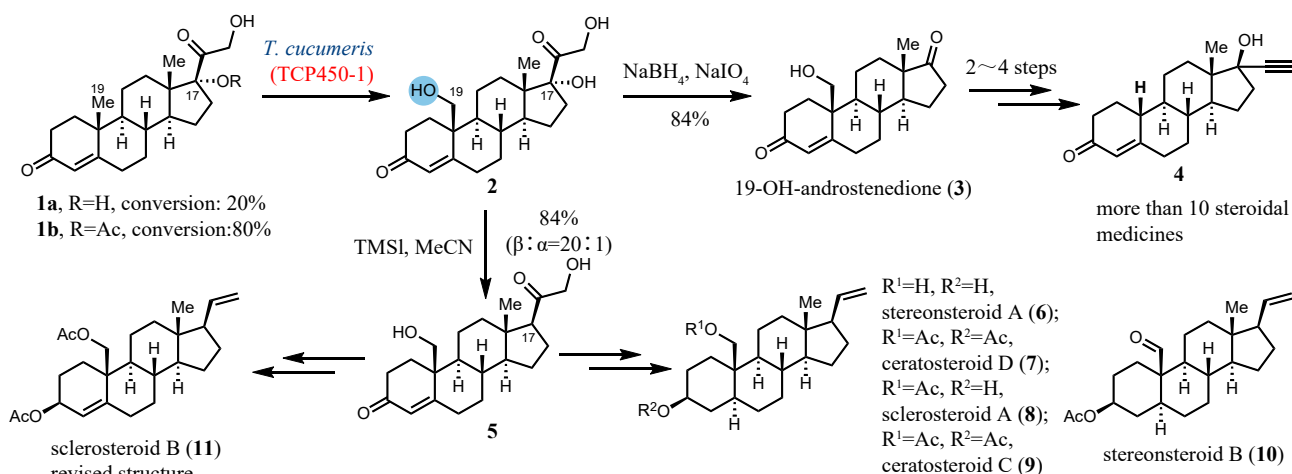


图2 stereosteroids 的化学-酶法合成

Fig. 2 Chemoenzymatic synthesis of stereosteroids

瘤^[27]、抗炎^[28]、抗病毒^[29]等活性，活跃于多项临床研究中。这类天然产物吸引了众多合成化学家的关注，在目前的合成路线中C14位羟基的引入主要依赖前期官能团的转化，导致合成效率较低^[30-32]。2022年，戈惠明、谭仁祥和俞寿云等^[33]从价格便宜的雄烯二酮（androstenedione, **13**）出发，利用P450酶催化高效引入C14位羟基，成功实现了强心苷天然产物 bufotalin (**18**)、bufogenin B (**19**)、digitoxigenin (**21**) 的高效合成（图3）。

首先，他们选取能够产生强心苷分子的植物牛角瓜（*Calotropis gigantea*）和宿主动物蟾蜍（*Bufo gargarizans*）作为研究对象进行了P450酶挖掘，分别发现了CYP11411和CYP44476两种酶，能够氧化孕酮（progesterone, **12**）和雄烯二酮（androstenedione, **13**）C14位产生 α -OH，其中CYP44476还能够催化甾体的C6、C9、C15位形成羟基[图3(a)]。但由于上述酶的异源表达转化效率较低，因此他们最终采用新月弯孢菌（*Curvularia lunata* CGMCC 3.9012）以二甲基亚砜（DMSO）作为共溶剂进行全细胞生物转化，能够以70%的分离产率得到克级规模的C14 α -OH-雄烯

二酮（**14**）。随后，通过消除和Mukaiyama水合等多步化学转化实现了C14位羟基立体构型的翻转，并得到共同中间体**15**。从该化合物出发，通过与锡试剂**16**进行Stille偶联，引入了六元不饱和和内酯环，构建了强心苷的基本骨架，再经氧化态调整和保护基脱除，完成了bufotalin (**18**)和bufogenin B (**19**)的合成。同样以**15**作为中间体，以马来酸酐参与的类S_N2自由基偶联作为关键策略，成功引入了五元内酯环，并通过苯基硒衍生物氧化等转化得到了目标产物digitoxigenin (**21**) [图3(b)]。

1.3 periplogenin等强心苷的化学-酶法合成

鉴于甾体C14位羟化酶CYP11411和CYP44476异源表达效率低、底物范围受限的缺点，近期瞿旭东与周强辉课题组^[34]合作通过菌株筛选、基因挖掘以及在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中的异源表达，从新月弯孢菌（*C. lunata*）中挖掘了一个新的C14 α 羟化酶CYP14A。作者利用RoseTTaFold预测了其孕酮（progesterone, **12**）的结合模式，并通过饱和突变和迭代饱和突变的

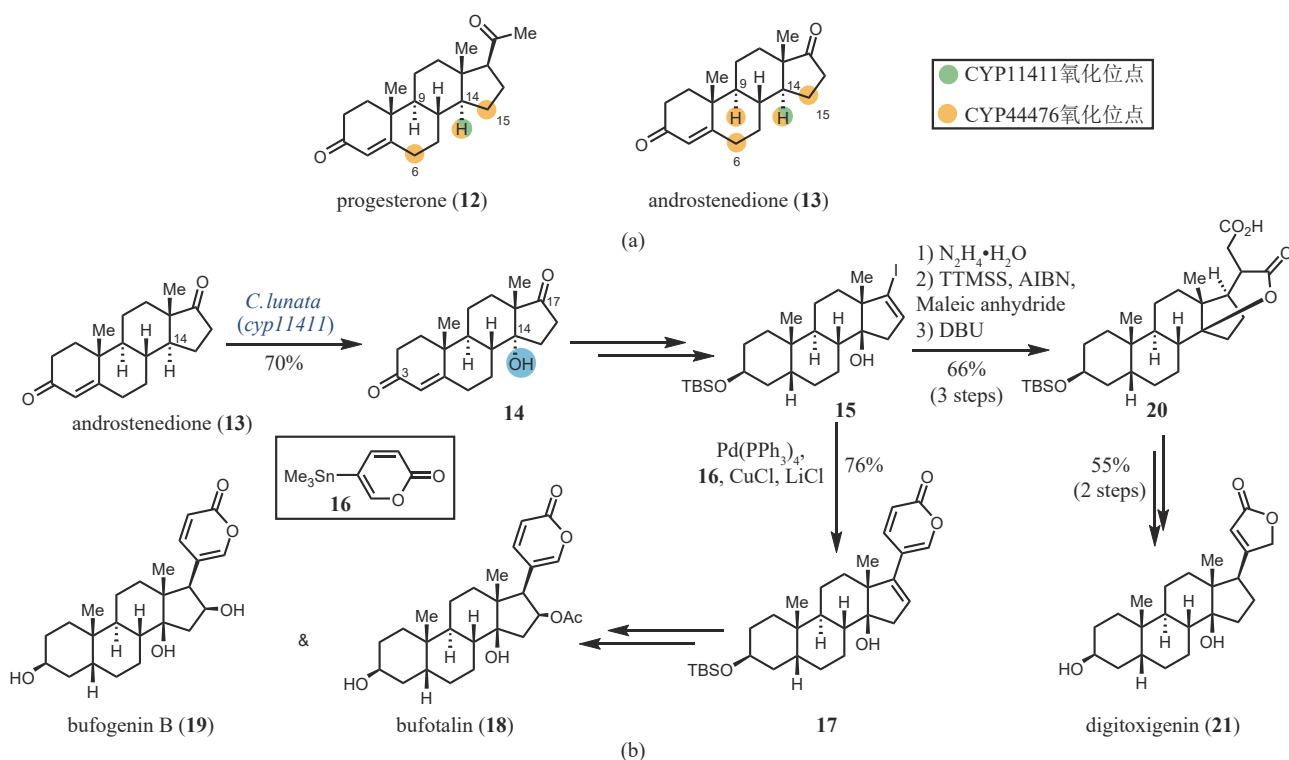


图3 CYP11411和CYP44476的区域选择性(a)和bufotalin、bufogenin和digitoxigenin的化学-酶法合成(b)
Fig. 3 Regioselectivity of CYP11411 and CYP44476 (a) and chemoenzymatic synthesis of bufotalin, bufogenin and digitoxigenin (b)

方式获得了两株性能优良的突变体 I111L-V124W 和 I111L-M115K, 提高了反应的区域选择性, 特别是 CYP14A I111L-V124W 在甾体底物 (12, 22~24 等) 上均展现出良好的结果 [图4(a)和(b)]。

为了验证该反应的合成应用价值, 作者以两个具有较高药用价值的强心甾天然产物, digitoxigenin (27) 和 periplogenin (31) 为目标展开了合成研究 [图4(c)]。以 22 为起始原料, DMSO 为共溶剂, 通过全细胞生物转化可以在克级规模以 68% 的收率得到 C14 羟基化产物 25。经过催化氢化和消除对 25 的官能团进行调整后, 利用 Bestmann 叶立德试剂构建五元内酯环可以得到共同中间体 26。随后, 分别使用 L-selectride 和 NaBH₄ 对 C3 位羰基进行还原, 得到两种构型不同的醇, 再经由 Mukaiyama 水合反应以 6 步完成 (+)-digitoxigenin (27)、(+)-3 α -hydroxydigitoxigenin (29) 及其他两个 C3 位和 C14 位非对映异构体的合

成。同样从 25 出发, 经过相似的反应转化可以得到 30, 随后经环氧化、选择性环氧开环和 C3 位羰基还原等五步反应, 以 9 步完成了天然产物 periplogenin (31) 的高效无保护基合成。

1.4 trenbolone 等甾体药物的化学-酶法合成

trenbolone (34) 是一种睾酮类似物, 其 C11 和 C12 位的双键减缓了代谢速度, 显示出作为睾酮的治疗替代品的巨大潜力 (图5)^[35]。在前人的合成路线中需要从 32 出发通过 4 步化学转化得到, 合成效率较低^[36]。2020 年, Reetz、李爱涛等^[37]合作对 P450_{BM3} 进行定向进化, 得到了突变体 LG-23, 可以实现睾酮 (testosterone) 等六个甾体天然产物 C7 β 位 C-H 键的选择性氧化, 极大地提高了 C7 官能化效率。在随后的研究中, 李爱涛课题组^[38]发现当该突变体作用于 32 时, 反应位点会发生变

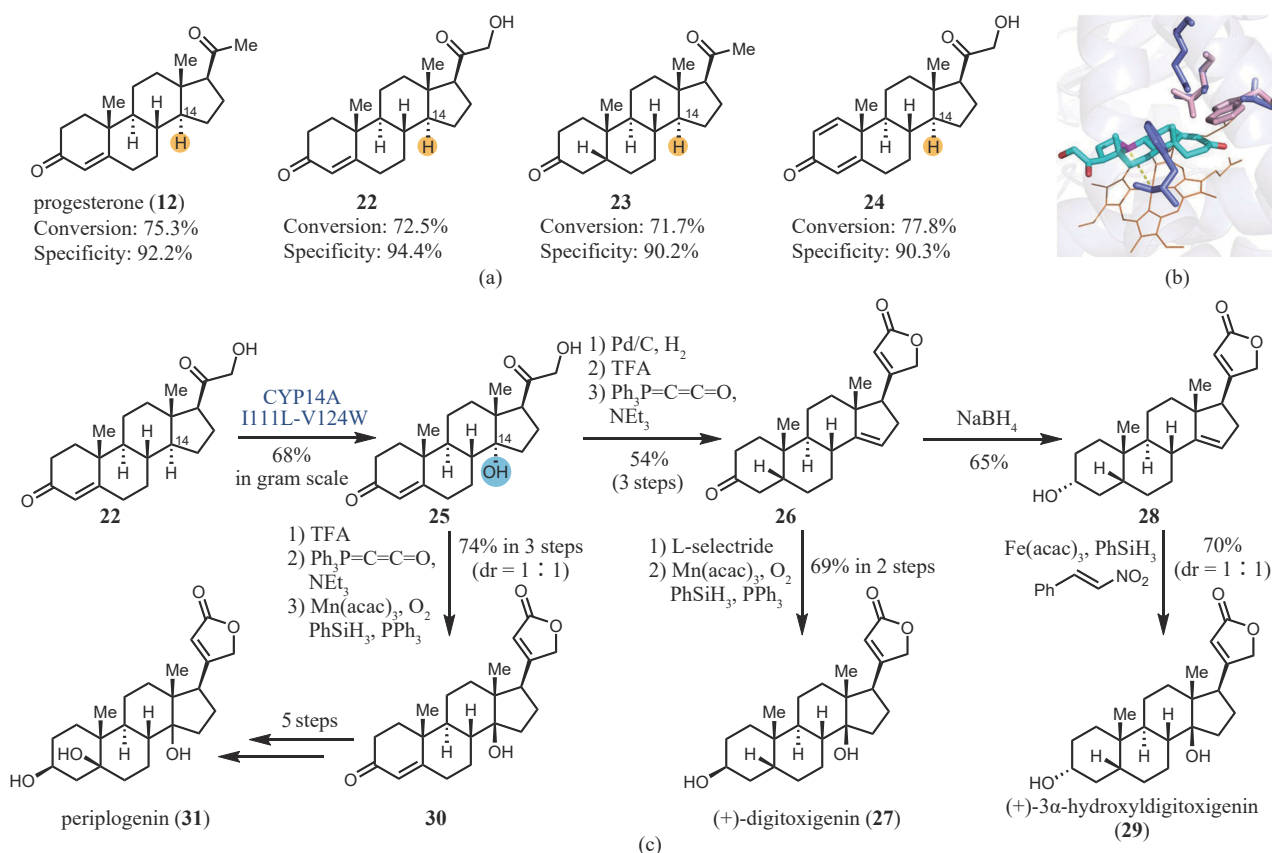


图4 CYP14A I111L-V124W的区域选择性 (a), 野生型CYP14A和突变体的对比 (b)和digitoxigenin、3 α -hydroxydigitoxigenin和periplogenin的化学-酶法合成 (c)

Fig. 4 Regioselectivity of CYP14A I111L-V124W(a), comparison of the wide-type CYP14A and mutant(b), and chemoenzymatic synthesis of digitoxigenin, 3 α -hydroxydigitoxigenin and periplogenin(c)

化, 能够以极高的选择性实现 C11 α 位的羟基化。随后, 他们通过对 T438 位点的定点饱和突变得到了 LG-23/T438S, 进一步提升了催化活性和反应选择性。利用 *Cochliobolus lunatus* 中的 17-甾酮还原酶 (17 β -HSDcl), 他们构建了重组全细胞催化剂大肠杆菌 (LG-23/T438S+HSDcl), 使用粗酶裂解液, 以 DMF 为共溶剂, 同时实现了甾体 (32) C11 α 位的羟基化以及 C17 位的羰基还原, 在 PTSA 存在下进行选择性脱水得到了 trenbolone (34), 并快速合成用于预防疯牛病的 trenbolone acetate (35)。

C7 功能化甾体药物显示出了作为神经保护和抗炎剂治疗中风、脑创伤和脑缺血等慢性神经元损伤的重大潜力。但已有的生产方法涉及费力且对环境不友好的五步化学转化, 导致效率低^[39]。通过相似的多酶级联策略, 李爱涛课题组^[40]利用“一锅两步法”在 P450_{BM3} 突变体 LG-23 和酮还原酶 17 β -HSDcl/V161G 的全细胞催化下, 以克级规模先后实现了 androstenedione (13) C7 β 位的羟基化和 C17 位的羰基还原, 为 mibolerone (38) 等 C7 功能化甾体药物的关键前体 37 提供了更加高效的合成方案。

2 P450 选择性氧化在萜类化学-酶法合成中的应用

2.1 萜类生物碱 nigelladine A 的化学-酶法合成

nigelladine A (48) 是一种分离自 *Nigella glandulifera* 的去甲二萜生物碱, 具有高度共轭的

骨架结构特征, 并表现出优异的蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 抑制活性 (图 6)^[41-42]。2017 年, Stoltz 和 Arnold 课题组^[43] 以后期 C-H 键选择性氧化为关键策略, 合作完成了该分子的首次全合成。整条合成路线从烯酮 39 出发, 将其转化为肼 40 之后再经过酰化、水解、甲基化三步反应得到 β -酮酯 41。随后以 42 为手性配体通过不对称烯丙基化反应以 87% ee 值得到化合物 43。再通过 Tsuji-Wacker 氧化、Robinson 环化以及羰基 α 位溴代反应合成偶联前体 44。紧接着, 与片段 45 进行 Suzuki 偶联^[44] 并且脱保护、缩合构建了天然产物的基本骨架。最后, 在 C7 位选择性氧化的过程中, 作者尝试了多种已知的烯丙基氧化方法, 但是反应的区域选择性差, 且无法有效分离。因此, 他们对 P450_{BM3} 的突变体进行了筛选^[45], 发现最初作用于糖类化合物选择性氧化脱保护的突变体 P450_{BM3} 8C7 对化合物 47 展现出了最优的效果。作者以 DMSO 为共溶剂直接使用粗酶裂解液进行反应, 能够以 >2.5 : 1 的区域选择性得到 C7 位选择性氧化的产物。该反应可以在 160 mg 的规模进行, 并且通过与醇脱氢酶 (ADH) / 异丙醇组成的 NADPH 再生体系联用, 极大地降低了成本。随后在 Dess-Martin 氧化剂的作用下, 以两步 21% 的收率得到了目标天然产物 nigelladine A (48)。

2.2 phenylpyropene 等 α -吡喃酮类杂倍半萜的化学-酶法合成

3-羟基补身烷结构是 α -吡喃酮类杂倍半萜的核心骨架结构, 这类天然产物具有出色的生物活性,

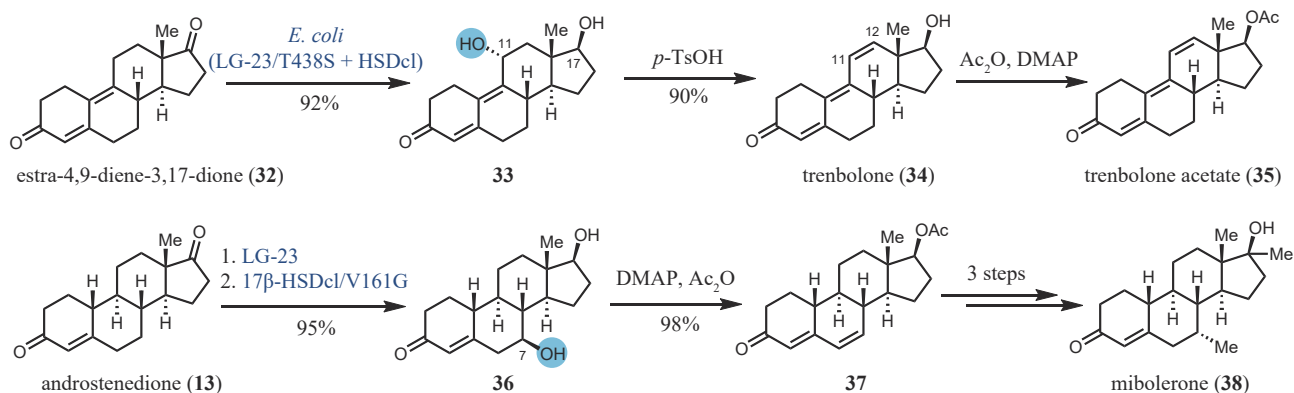


图5 trenbolone 等的化学-酶法合成

Fig. 5 Chemoenzymatic synthesis of trenbolone and related compounds

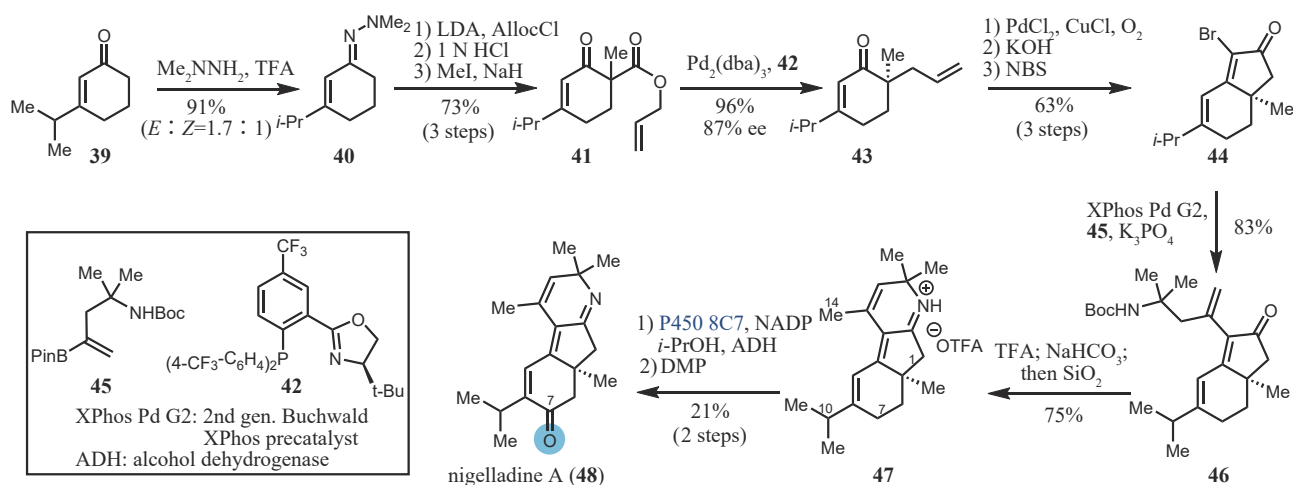


图6 niggelladine A的化酶法合成

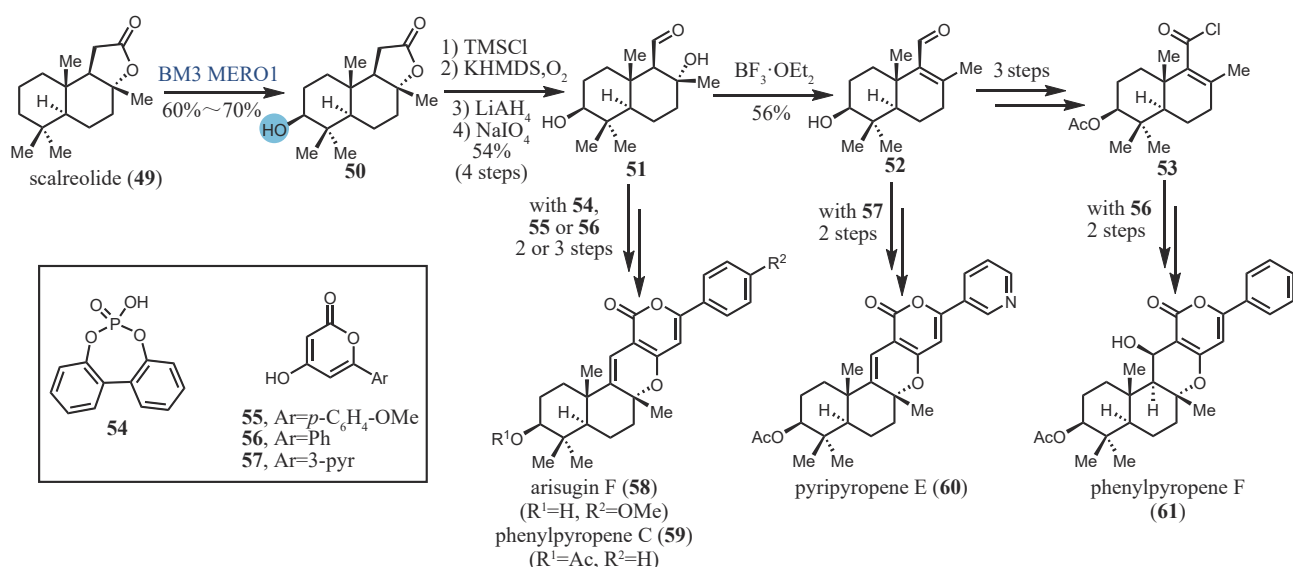
Fig. 6 Chemoenzymatic synthesis of niggelladine A

是潜在的酰基辅酶 A-胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 抑制剂和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂^[46]。为了对其生物活性和构效关系展开深入研究, 多位合成化学家完成了该家族天然产物的全合成, 常见的合成策略主要包括以多烯串联环化为核心的线性合成^[47-48] 以及从 Wieland-Miescher 酮出发的模块化组装^[49-50], 但二者均存在反应效率低和选择性欠佳的问题。Renata 课题组^[51] 的合成路线从酶催化的香紫苏内酯 (49) 选择性氧化开始, 将亚磷酸脱氢酶 Opt13 与 P450_{BM3} 突变体 MERO1 联用, 实现了反应过程中 NADPH 的循环, 极大地降低了生产成本 (图 7)。以 DMSO 为共溶剂, 使用粗酶裂解

液可以克级制备 C3- β -OH-香紫苏内酯 (50)。然后通过四步反应对内酯环进行氧化切断得到 β -羟醛 (51)。随后, 结合形式 [3+3] 环加成和氢原子转移 (HAT) 还原等高效转化, 完成了 arisugin F (58)、phenylpyropene C (59) 以及 pyripyropene E (60) 的合成。共同中间体 52 也可被转化为酰氯 53, 再经 Friedel-Crafts 酰基化、环化、还原羰基, 最终以较高的收率得到 phenylpyropene F (61)。

2.3 taondiol 等杂二萜的化学-酶法合成

完成上述 α -吡喃酮杂倍半萜的化学-酶法合成

图7 α -吡喃酮类杂倍半萜的化学-酶法合成Fig. 7 Chemoenzymatic synthesis of α -pyrone meroterpenoids

之后, Renata 课题组^[51]又将目光投向了 taondiol、chevalone A 等活性杂二萜(图8)。由于 MERO1 对起始原料香紫苏醇(62)的羟基化活性较低,他们将后者经五步反应转化为羧酸 63,并对反应过程产生的所有中间体进行了酶催化反应筛选,发现突变体 MERO1 L75A 对羧酸 63 的 C3 羟基化活性最高,以重组大肠杆菌裂解液为生物催化剂, DMSO 为共溶剂,能够以 62% 分离产率在克级规模选择性引入羟基。一方面, 64 经 Barton 脱羧转化成碘化物 66,进一步消除后可得到二烯 67,这两个化合物均为后续合成的共同中间体。其中碘化物 66 分别与 68 和 69 发生 Ni 催化的还原偶联^[52],能够以较高的收率得到对应的偶联产物,再分别经过两步反应构建 D 环,完成了 taondiol (71) 和 chevalone A (72) 的合成。另一方面,二烯中间体 67 与吡喃酮(57)发生单电子转移的 [3+2] 环加成反应得到 decaturin E (73); 在电化学的条件下与 70 发生类似的环加成反应,再经氢原子转移氢化、脱除甲基得到了 stypodiol (74)。

2.4 chrodrimanins 等 *trans-syn* 构型补身烷类杂倍半萜的化学-酶法合成

补身烷类天然产物一般由萜烯环化酶催化环

氧多烯通过全椅式过渡态环化生成,得到热力学稳定的 *trans-anti-trans* 构型;然而,少数天然产物则通过热力学不稳定的船式过渡态以 *trans-syn* 类构型存在。这一类型的天然产物具有较高的合成挑战性,前人通过经典化学合成^[53-57]以及萜烯环化酶参与的化学-酶法合成策略^[58-59]进行了合成研究,但均存在效率差、对映选择性低、合成路线长等缺陷。2021年, Renata 课题组^[60]以 C9 位差向异构化的香紫苏内酯(75)为起始原料,结合 P450 酶生物氧化策略,实现了 chrodrimanin C (87) 等 4 种 *trans-syn* 构型的补身烷类杂倍半萜的合成(图9)。

对于 polysin (78) 和 *N*-acetyl-polyveoline (79) 的合成,可以从酸性条件下香紫苏内酯(49) C9 位的差向异构化开始。经过针对产物 75 的 P450_{BM3} 突变体筛选,他们发现原本用于甾体羟基化的突变体 KSA15^[61]具有一定的底物杂泛性,能够以中等的收率实现 C3 位的羟基引入。随后,以 Smith-Madlung 吡啶合成^[62]以及蒙脱土 K10 介导的 Friedel-Crafts 环化为关键策略,经过 4 步转化同时得到了 *trans-syn-cis* 构型的 C 环化和 N 环化的产物,可经由官能团的调整分别以 7 步和 8 步的总步骤转化为 polysin (78) 和 *N*-acetyl-polyveoline (79)。对于 chrodrimanin C (87) 和 verruculide A (88)

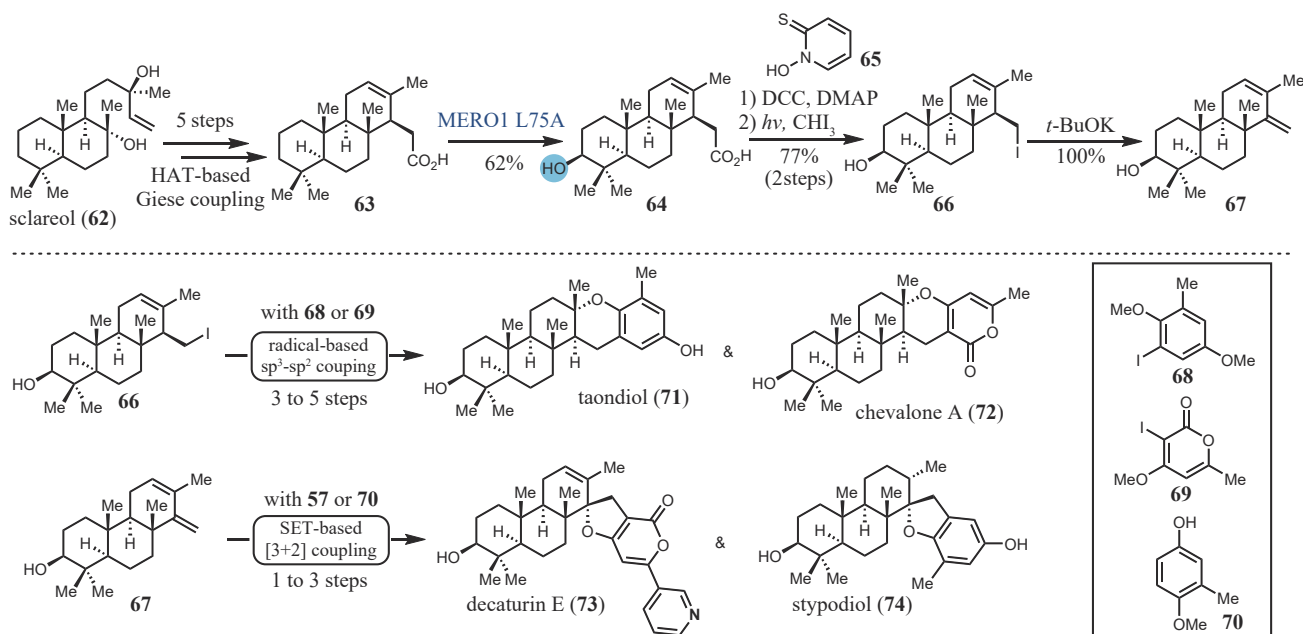


图8 杂二萜的化学-酶法合成

Fig. 8 Chemoenzymatic synthesis of meroditerpenoids

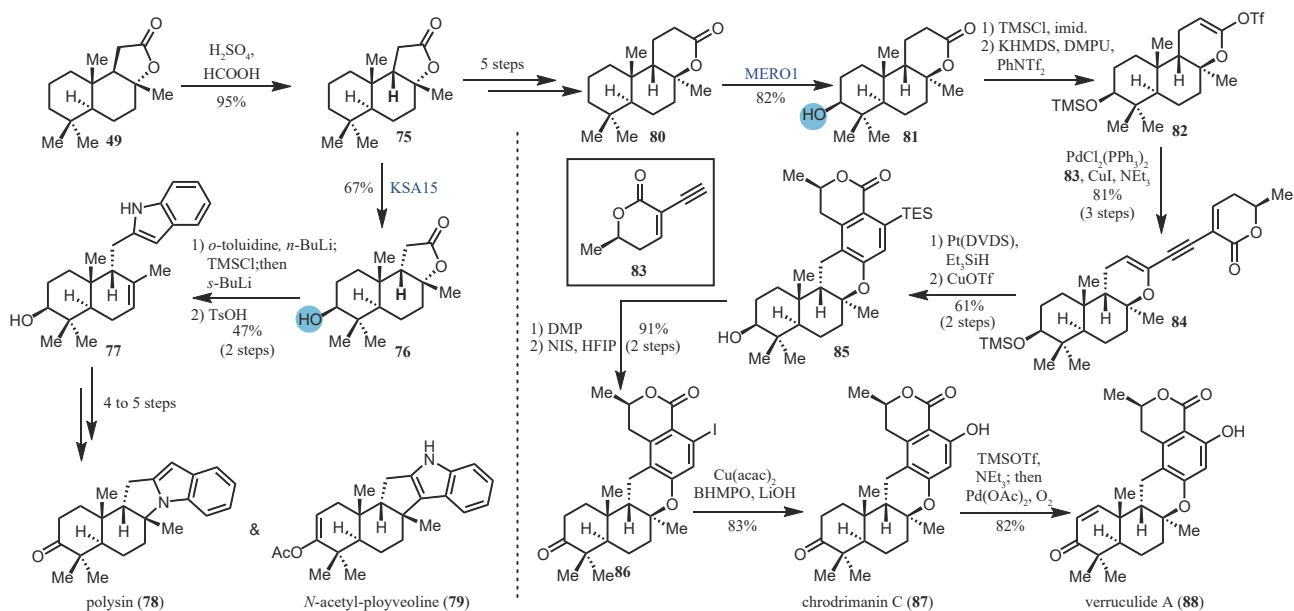


图9 *trans-syn* 构型补身烷类杂萜的化学-酶法合成

Fig. 9 Chemoenzymatic synthesis of *trans-syn* drimane-type meroterpenoids

的合成同样从 9-*epi*-香紫苏内酯 **75** 出发, 经过 Arndt-Eistert 反应等五步转化可得到 *trans-syn-trans* 构型的 δ -内酯 **80**。以 DMSO 为共溶剂在粗酶裂解液的作用下, 该内酯能够以 82% 的产率在克级规模实现 C3 位选择性的羟基化, 保障了后续路线的顺利开展。羟基化的中间体 **81** 经由两步转化后与烯炔 **83** 发生 Sonogashira 偶联得到 **84**。这一关键中间体通过 Pt 催化选择性硅氢化反应, 以及 CuOTf 参与的 6π 电环化和氧化芳构化完成天然产物骨架的构建, 并选择性引入硅基作为后续转化的化学抓手。最后, 经由 Cu 催化的 Ullman-Ma 偶联^[63] 等三步反应引入酚羟基, 完成 chrodriamanin C (**87**) 的全合成, 并在 Saegusa 氧化的条件下得到 verruculide A (**88**)。值得一提的是, 上述的四个天然产物均为首次合成报道。

2.5 柠檬苦素 gedunin 的化学-酶法合成

柠檬苦素类化合物是一类含有呋喃环并且高度氧化的四降三萜类天然产物, 具有广泛的结构多样性^[64] 和药理作用^[65-67], 吸引了诸多合成化学家^[68-70] 的关注。其中, gedunin (**95**) 是一种具有出色 HSP90 抑制活性的 D 环-*seco*-柠檬苦素, 高度氧化的碳环骨架和拥挤的 B/C/D 三环体系使其具有较大的合成挑战性, 目前仅有 Renata 课题组^[71] 从

香紫苏内酯出发, 以 P450_{BM3} 突变体催化的选择性羟基化为关键策略完成了该分子的全合成 (图 10)。

虽然香紫苏内酯可直接进行 C3 位羟基化, 但为了避免过多保护基的使用, 他们希望能够在合成的中后期引入羟基。于是, 通过甲基化内酯开环、Baeyer-Villiger 氧化、臭氧化和消除三步反应得到烯酮 **89**。随后, 以 DMSO 为共溶剂, 在 MERO1 L437A 粗酶裂解液的作用下, 得到 C3 位氧化产物 **90**。另外, 他们采用 Krische 报道的 Ir 催化不对称烯丙基化反应为关键策略构建了片段 **91**^[72]。片段 **90** 和 **91** 在 Luche 偶联条件下, 以 93% 的收率得到 **92**, 后者经过 Wittig 反应、Dess-Martin 氧化可得到二酮 **93**。烯丙位氧化后紧接着在 Giese 偶联条件下完成天然产物核心骨架的构建, 得到环化产物 **94**。然后, **94** 经过 Saegusa 氧化、环氧化等四步转化, 最终以最长线性步骤 13 步实现了高度氧化的天然产物 gedunin (**95**) 的全合成。

2.6 excolide B 等的化学-酶法合成

在上述以香紫苏内酯及其衍生物作为酶催化底物的天然产物化学-酶法合成中, 选择性氧化的位点均集中在 A 环的 C3 位。实现多位点的选择性氧化有助于拓展其后续转化的化学空间, 能够进一步提高复杂天然产物的合成效率^[73]。2022 年,

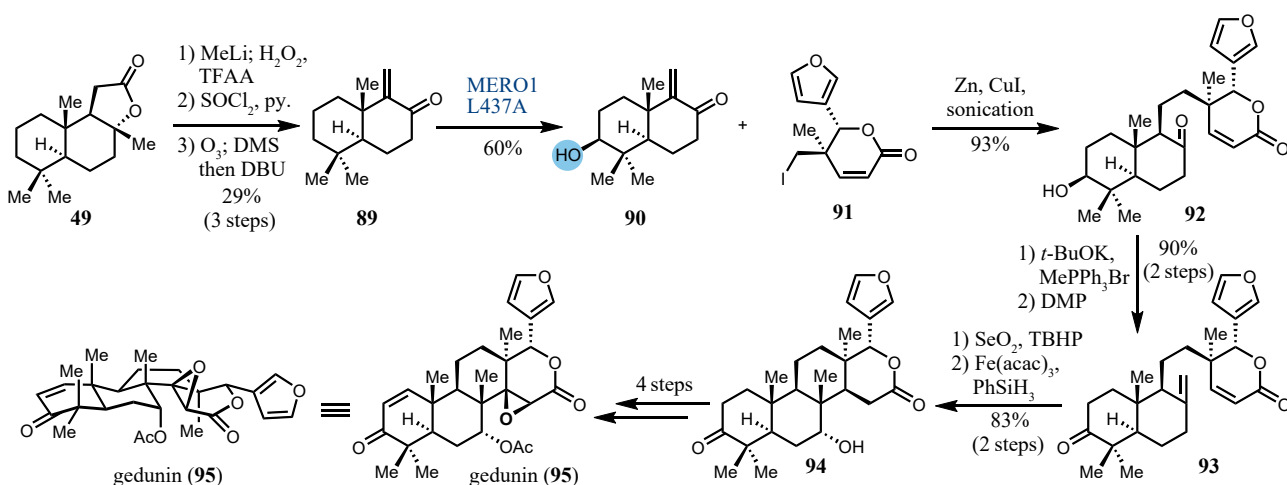


图10 gedunin的化学-酶法合成

Fig. 10 Chemoenzymatic synthesis of gedunin

Renata 课题组^[74]发现原本作用于睾丸酮 (testosterone) C7 位羟基化的 P450_{BM3} 突变体 LG-23^[37] 能够以较低的转化率在香紫苏醇 **62** 的 C6 位引入 α -羟基, 基于迭代饱和和突变进行两轮定向进化后, 突变体 LG-23 L181F L437G 能够将催化效率提升 6 倍, 并体现出一定的底物杂泛性。作者以 DMSO 为共溶剂, 在 LG-23 L181F L437G 的粗酶裂解液作用下, 能够以 66% 的产率得到克级规模的 B 环氧化产物 **96**, 并应用于合成抗 HIV 活性天然产物 ansellone B (**102**) (图 11)。**96** 经过连续两步氧化反应实现 C9 位侧链的氧化切断, 得到了 C6- α -OH-香紫苏内酯 (**100**)。再对其进行 TBS 保护之后, 通过 α -羟基化等三步转化便可以 7 步的总步骤得到 ansellone B (**102**) 合成中的高级中间体 **101**。与 Tong 课题组^[75] 报道的合成路线相比, Renata 课

题组^[74]采用的酶催化反应能够实现羟基的快速选择性引入, 将合成路线缩短了 10 步。同时, 在两种不同的 P450_{BM3} 氧化酶突变体的协同作用下, 可以分别实现香紫苏醇 A 环 C3 位和 B 环 C6 位的选择性氧化, 得到不同氧化度的香紫苏醇衍生物 (**97**~**99** 等)。两个羟基位点的引入带来了更多的反应可能性, 通过仿生的骨架断裂和重排反应, 实现了化合物 **98** 中 A 环的切断, 完成了 excolide B (**103**) 的首次合成。这体现了羟基的引入不仅可以作为天然产物的官能团, 同时也可以成为复杂化学转化的抓手。

2.7 ent-kaurane, ent-atisane, ent-trachylobane 类型二萜的化学-酶法合成

ent-kaurane、ent-atisane、ent-trachylobane 是三

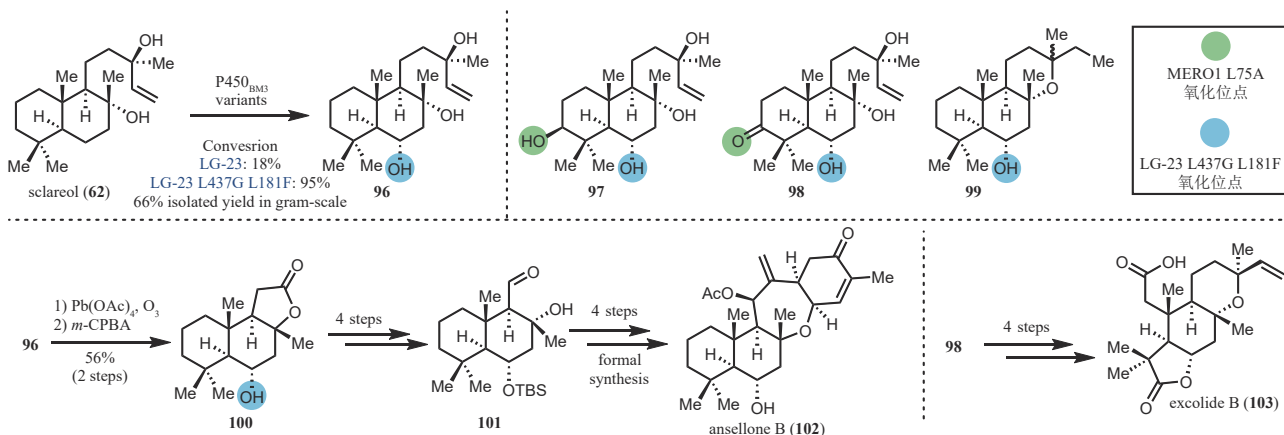


图11 Excolide B 等的化学-酶法合成

Fig. 11 Chemoenzymatic synthesis of excolide B and related compounds.

种在生源合成中密切关联的二萜天然产物家族，它们具有广泛的生物活性，能够抑制离子通道、信号传导级联以及炎症小体^[76-77]，结构上的差异主要在于其C/D环的连接方式^[78]。由于分子结构复杂，从简单原料出发的从头合成难度较大^[79-80]；而从甜菊醇等天然原料出发的半合成策略也因缺乏骨架修饰的化学工具而受到较大限制，难以广泛应用^[81-83]。利用Shen等对平板霉素生物合成过程中表征的多个羟化酶^[84-85]，Renata课题组^[86]对这三类骨架的酶催化选择性氧化展开了研究（图12）。其中，Fe/ α KG依赖型氧化酶PtmO6能够以较高的催化活性实现B环C7位的羟基化；将P450酶PtmO5与还原酶伴侣RhfRed进行融合后，并在分子伴侣GroES和GroEL的存在下，可以提高甜菊醇C环C11位羟基化的效率。除此之外，通过对该课题组特色的P450_{BM3}突变体元件库进行筛选后发

现MERO1 M177A能够选择性地氧化A环，得到C2位羟基化产物。Renata课题组结合三种不同酶参与的选择性氧化策略分别实现了上述3类天然产物家族A、B、C环系的选择性氧化，以多个酶的联用完成了10个高氧化度二萜活性天然产物的化学-酶法合成。

C7和C11氧化的*ent*-kaurane家族天然产物rosthornins的合成从甜菊醇（104）出发，首先在纯酶PtmO6的生物催化下，以DMSO为共溶剂，实现C7 β C—H键的氧化，并在后续化学氧化中转化为酮105（图12）。后者可以在PtmO5-RhfRed粗酶裂解液的作用下，以DMSO为共溶剂，在C11位以65%的产率引入羟基，得到106。随后，通过4步反应实现C7、C15和C19位氧化态的调整，完成了该家族两个天然产物rosthornin B（108）和rosthornin C（107）的高效

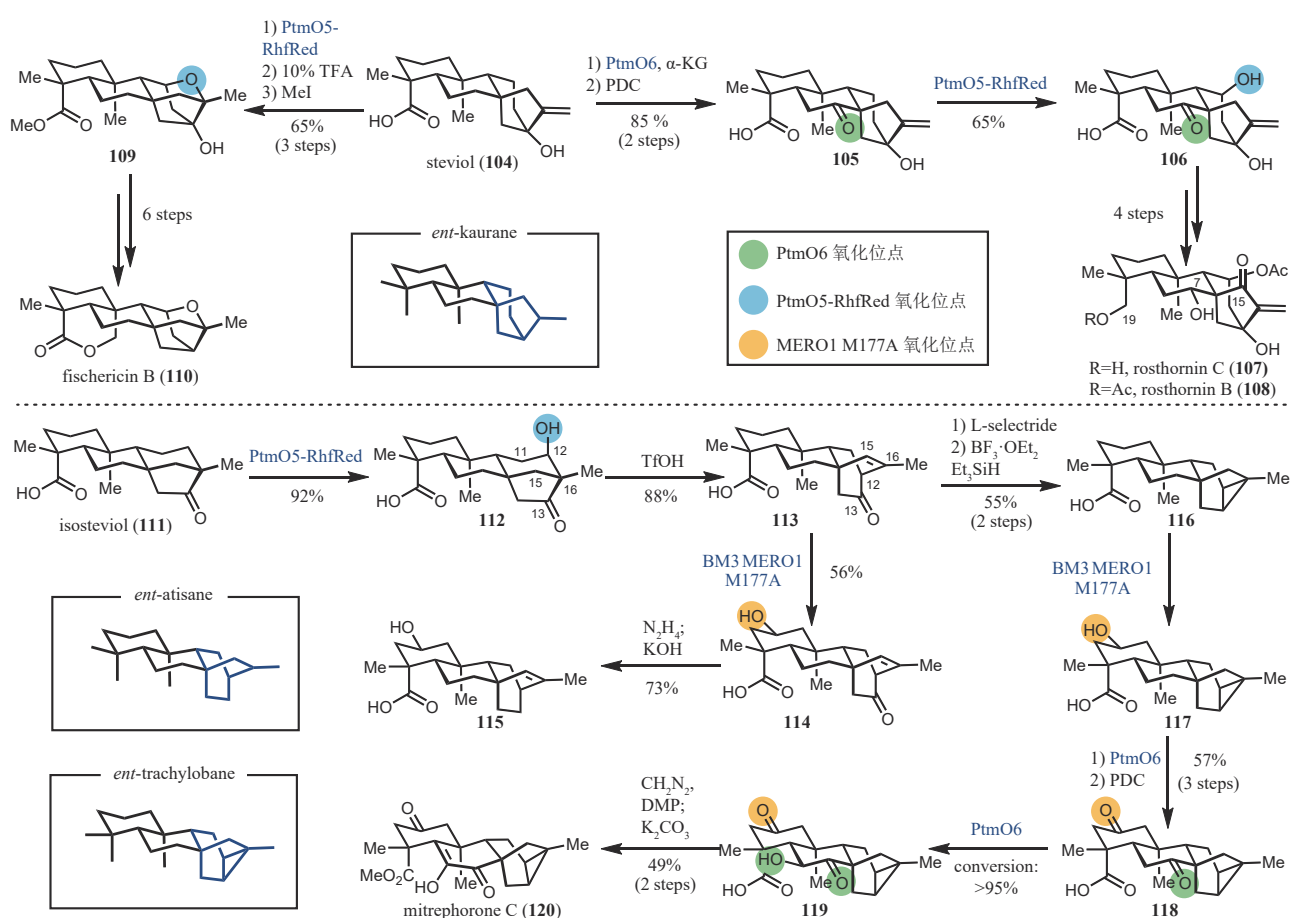


图12 *ent*-kaurane, *ent*-atisane, *ent*-trachylobane二萜的化学-酶法合成
Fig. 12 Chemoenzymatic synthesis of *ent*-kauranes, *ent*-atisanes, *ent*-trachylobanes

合成。甜菊醇 **104** 还可直接利用融合酶 PtmO5-RhfRed, 经过同样的生物催化方式, 实现 C11 位羟基化, 酸性条件下成醚并且甲酯化, 得到笼状环醚 **109**。然后, 化合物 **109** 经过 Barton 脱氧等 6 步转化, 最终以 9 步实现了 fischericin B (**110**) 的全合成。

紧接着, 他们意外发现以异甜菊醇 (**111**) 作为底物时, PtmO5-RhfRed 的氧化位点从 C11 位转移到了 C12 位, 为 C/D 环的碳正离子重排提供了化学抓手。在 TfOH 的作用下, **112** 通过 Wagner-Meerwein 重排可以得到 *ent*-atisane 骨架 **113**。在 MERO1 M177A 粗酶裂解液的生物催化下, 以 DMSO 为共溶剂, 能够得到 C2 位羟基化的中间体 **114**, 并经由 Wolff-Kishner 脱氧得到生物碱 cochleareine 合成的关键前体 **115**。与此同时, **113** 还可以被还原为醇, 并在 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 和 Et_3SiH 的作用下进行还原性重排得到 *ent*-trachylobane 骨架 **116**。从 **116** 出发, 经 MERO1 M177A 和 PtmO6 酶催化反应先后在 C2 和 C7 位引入羟基, 并由 PDC 氧化得到二酮化合物 **118**。后者可以继续 PtmO6 的作用下得到 C6 位羟基化的产物 **119**, 并在甲酯化、DMP 氧化等条件下转化为 mitrephorone C (**120**)。在该天然产物的合成过程中, 作者先后使用了 4 次酶催化羟基化, 分别在 C/A/B 环上选择性引入氧化度, 极大缩短了合成路线。在同一篇报道中, 他们还合成了这三个家族其他一些天然产物, 由于没有用到 P450 氧化酶, 这里不做赘述。

3 P450 选择性氧化在其他类型天然产物化学-酶法合成中的应用

3.1 聚酮 aureothin 的化学-酶法合成

aureothin (**126**) 是链霉菌 *Streptomyces thioluteus* 中分离得到的一种较为罕见的含硝基聚酮类天然产物, 具有抗癌、抗真菌、杀虫等多种活性 (图 13)^[87]。之前的合成研究表明, 如何对映选择性地实现四氢呋喃环的构建是合成这一天然产物的主要难点^[88-90]。而在生物合成途径中, 该结构是通过一个独特的双功能 P450 酶 AurH 对 C9 α 和 C7 位连续氧化实现的^[91-93]。2008 年, Hertweck 课题组^[94] 以该酶催化转化为关键策略完成了 aureothin 的首次不对称合成。以四氮唑乙酯 **121** 为起始原料, 通过 Julia 烯化等四步转化后可以得到不饱和酯 **122**。后者经甲基化得到 **123**, 随后转化为有机 Sn 试剂用于后续的 Stille 偶联。在与芳基碘 **124** 偶联后, 通过全细胞生物转化的方式, 以 DMSO 为共溶剂, 在 P450 酶 AurH 的作用下可以实现羟基化进而安装呋喃环, 以中等收率得到最终的自然产物 (**126**)。

为了进一步提高合成效率, 该课题组在 2012 年对合成路线进行了优化^[95]。作者通过 1,3-二噻烷与不饱和吡喃酮共轭加成, 串联与溴代物的亲核取代反应, “一锅法” 完成天然产物骨架的构建。随后利用化合物 **127** 通过氧化脱硫和羰基还原以 50%~64% 收率得到外消旋体 **rac-128**。作者通过相同的生物催化方式, 在 P450 单加氧酶 AurH 的催化

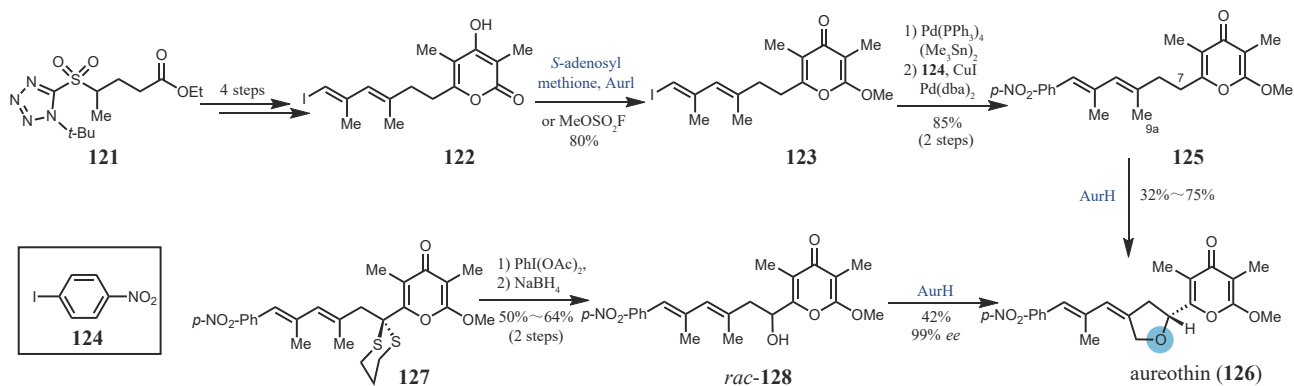


图 13 聚酮 aureothin 的化学-酶法合成

Fig. 13 Chemoenzymatic synthesis of aureothin

下, 消旋的 **128** 可经过动力学拆分过程以 42% 收率和 99% ee 值得到 aureothin (**126**)。这一汇聚式的合成路线极大缩短了合成步骤, 为其他 aureothin 类似物的合成提供了基础。

3.2 糖肽类抗生素 vancomycin 苷元类似物的化学-酶法合成

糖肽类抗生素万古霉素 (vancomycin) 被认为是治疗细菌感染的最后防线^[96-97]。它是一个化学结构独特的刚性七肽, 含有 6 个非经典氨基酸、3 个大环、2 个芳环 C—O—C 醚键以及 1 个联苯 C—C 键^[98-99]。虽然许多知名的合成化学家如 Nicolaou、Boger、Evans 等完成了万古霉素的化学合成^[100], 但其合成依然具有极高的难度, 主要的挑战包括芳环 C—O—C 键和 C—C 键的构建。其生源合成研究揭示了三个 P450 酶的存在, 即 OxyB、OxyA 以及 OxyC, 可完成两个芳环 C—O—C 键和 C—C 键的构建^[101]。

通过固相多肽合成可得到线性七肽 **130**, 再与辅酶 A (CoA) 相连得到化合物 **131** (图 14)。CoA 可将多肽呈递给 X 结构域和多肽载体蛋白 (PCP)。X 结构域可以招募 OxyA、OxyB 等 P450 酶, 在无共溶剂条件下, 作用于两个芳环 C—O—C 键的偶联。2018 年, Seyedsayamdost 课题组^[102] 首次获得了具有体外活性的充足蛋白 OxyC, 并利用化学酶

法完成了 vancomycin 骨架的搭建。相似的策略也被应用于糖肽类抗生素 keratinimicin 苷元衍生物的化学-酶法合成中^[103]。

3.3 大环内酯类抗生素 juvenimycin 等的化学-酶法合成

juvenimycin 和 M-4365 属于强效的大环内酯类抗生素, 在结构上由 16 元大环内酯苷元和二甲氨基糖组成。2017 年, Sherman 课题组^[104] 探索了 juvenimycin 生物合成中的两种末端聚酮合酶 (PKS), 并结合糖基化和 P450 介导的选择性氧化实现 juvenimycin 家族多个天然产物合成。关键的中间体 **138** 通过 Myers 辅基参与的不对称烷基化反应构建, 在与片段 **139** 发生 HWE 偶联后, 通过硫酯形成得到 **140** (图 15)。后者在 PKS 装配线末端的两个模块 TyIGIV 和 TyIGV 的作用下, 延长碳链并大环内酯化得到苷元 tyllactone (**141**)。随后, 将苷元 **141** 在 *Streptomyces venezuelae* DHS316 中进行孵育, 能够以中等的收率得到糖苷化产物 M-4365 G₁ (**142**)。从该化合物出发, 在纯化的 TyII、JuvD 和 MycCl 等 P450 酶催化下, 以 DMSO 为共溶剂, 分别在骨架的 C20、C12/C13 和 C23 位引入氧化度, 并得到了活性更为出色的类似物 **147**, 展示了这类酶催化剂在复杂天然产物后期结构修饰方面的巨大潜力。

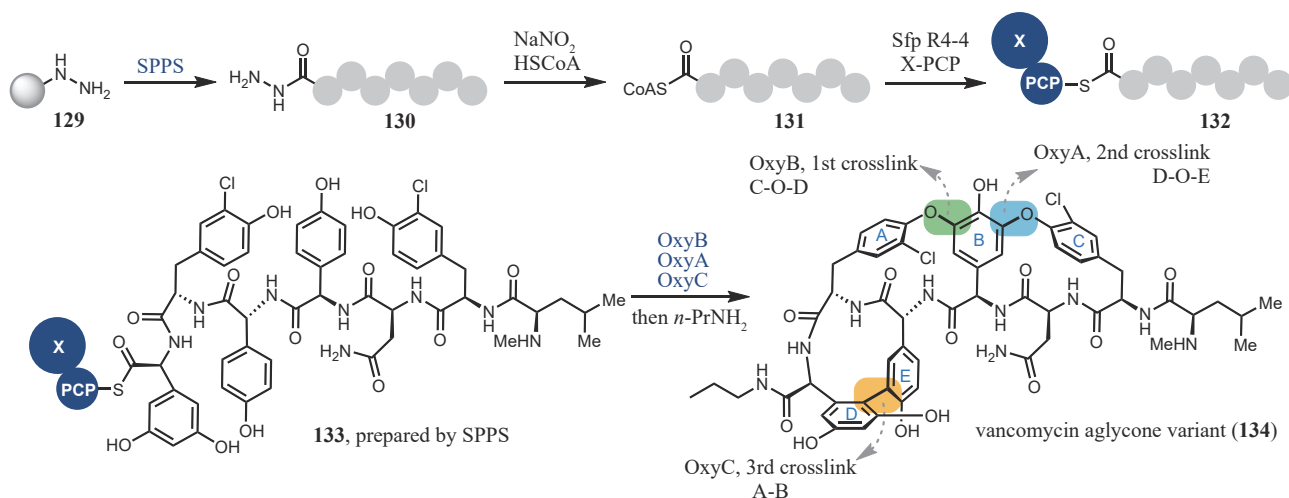


图 14 vancomycin 苷元类似物的化学-酶法合成

Fig. 14 Chemoenzymatic synthesis of vancomycin aglycone variant

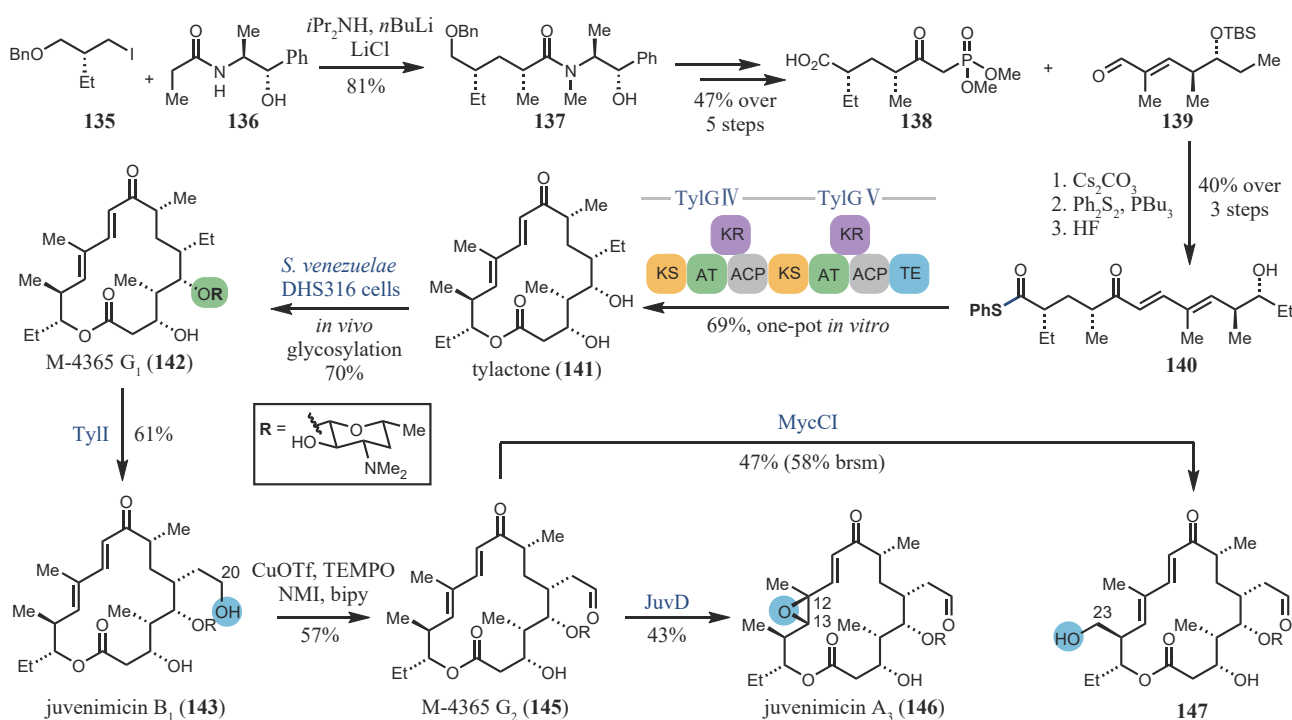


图15 juvenimvin的化学-酶法合成

Fig. 15 Chemoenzymatic synthesis of juvenimvins

3.4 环酯肽 cryptophycin 类似物的化学-酶法合成

这一策略还被应用于其他环肽类天然产物以及类似物的合成中。cryptophycin 是分离自蓝藻的一类含有 16 元大环结构的缩酚酸肽类活性天然产物^[105]，表现出强大的诱导微管蛋白解聚的能力^[106]。其中，其类似物 cryptophycin 52 (155) 曾被用于治疗非小细胞肺癌和耐铂卵巢癌，但因体内疗效有限，在临床 II 期终止^[107]。现有的合成路线显示，这类天然产物主要的合成挑战集中在选择性的内酯化和环氧化。为了解决上述难题，Sherman 课题组^[108]利用硫酯酶催化的大环内酯化反应和 P450 酶 CrpE 催化的选择性环氧化反应针对 cryptophycin 及类似物开发了一条高效的合成路线(图 16)。片段 150 可以从 148 和 149 出发通过 HWE 烯炔合成和 Suzuki 偶联合成。之后通过常规的酰胺偶联和脱保护操作得到环化反应的线性前体 152。随后以纯酶 CrpTE 为生物催化剂，无共溶剂条件下，可实现不同芳基取代底物 152 的大环内酯化，该反应具有较广的底物杂泛性。将 P450 酶 CrpE 与还原伴侣 Fdr/Fdx 融合可提高酶催化的效

率、降低反应的成本，作者以大环内酯 153 为底物，尝试了该融合酶催化的选择性环氧化反应。作者将纯酶 CrpE 作为生物催化剂，在无共溶剂条件下，能对多种芳基杂环底物实现环氧化，得到化合物 154，为后续的构效关系研究奠定了物质基础。

4 总结与展望

本综述总结了基于 P450 选择性氧化的天然产物化学-酶法合成进展。其中，P450 酶能够以出色的区域和立体选择性在温和的条件下解决惰性 C—H 键选择性官能化这一经典合成中的挑战性转化，符合绿色化学的未来发展要求^[109]。在合成化学家对目标天然产物进行逆合成分析时，有意识地将酶催化反应融入经典合成路线不仅能够提供全新的切断方式、改变合成设计的思路，更有助于提高合成效率、缩短合成路线并应用于活性天然产物的结构改造和构效关系研究。为了将 P450 氧化这一酶催化反应更好地整合进天然产物的化学-酶法合成，需要生物合成、化学合成、合成生物学、

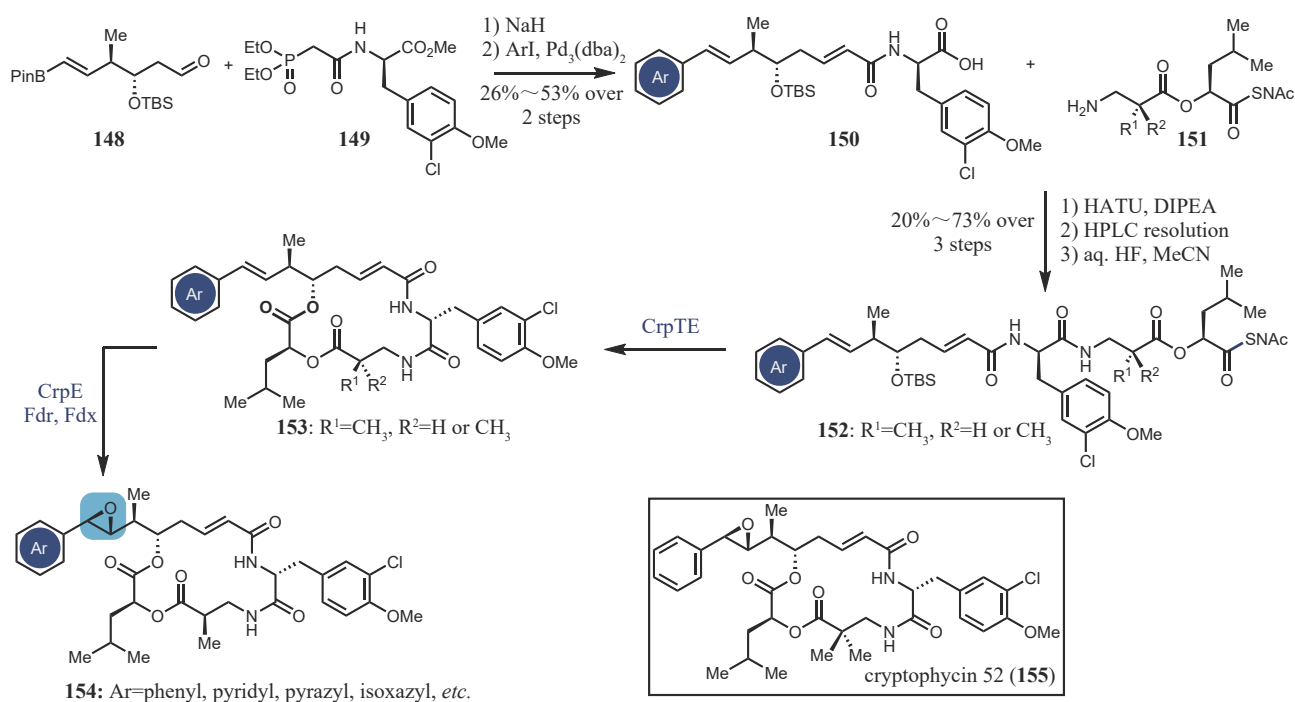


图 16 Sherman 课题组对 cryptophycin 类似物的化学-酶法合成

Fig. 16 Sherman's chemoenzymatic synthesis of cryptophycins derivatives

酶工程、机器学习等多个学科的努力。

首先，从拓展酶催化反应化学空间的角度出发，不应只局限于 P450 酶的天然功能。在上述化学-酶法合成案例中，P450 酶主要被用来选择性地引入羟基或实现 C—C 键的偶联等，反应类型较为单一。Arnold、Fasan 等多个课题组^[110]利用 P450 突变体生成铁卡宾中间体，用于 C—C、C—N、C—Si、C—B 构建以及环丙烷化等多种非天然反应类型；杨扬课题组^[111]成功改造了 P450 酶用于立体选择性的原子转移自由基环化 (ATRC) 反应。上述工作进一步拓展了 P450 酶的非天然功能，也展示了这类新于自然 (New-to-Nature) 反应活性的开发能够实现更多的挑战性转化，具有在天然产物等复杂分子合成中应用的潜力。

其次，酶催化剂的发现效率需要进一步提升^[112]。一方面，伴随着高通量测序方法的发展和 DNA 数据的积累，数字化的基因组挖掘不仅能够指导新的活性天然产物发现，也有助于表征其生物合成过程中的关键酶，不断丰富酶催化元件^[113]。另一方面，新兴研究手段能够助力酶的工程化改造。例如，Arnold 课题组^[114]利用计算建模、机器学习极大地缩减了定向进化的实验工作

量，同时实现了两种立体选择性的 Si—H 键的卡宾插入反应。

除此之外，其他一些多学科的交叉融合的研究手段也能够加速 P450 酶催化反应的开发，拓展其应用范围。例如，更加直接、可视化的高通量检测手段有助于筛选效率的提升^[115]；结合 AI 大数据的机器学习能够预测 P450 氧化反应在复杂底物上的反应位点，有望实现反应选择性的“指哪打哪”^[116]；酶催化逆合成分析软件的开发有助于合成化学家更好地理解 and 运用酶催化反应^[117]。总而言之，目前基于 P450 选择性氧化的天然产物化学-酶法合成研究受到了越来越多的关注，跨学科、多领域的技术进步为合成化学与合成生物学的研究搭建了沟通的桥梁，在不久的将来包括 P450 在内的酶催化反应有望成为合成化学家解决挑战性问题的常规工具。

参 考 文 献

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] NEWHOUSE T, BARAN P S, HOFFMANN R W. The

- economies of synthesis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(11): 3010-3021.
- [3] KUTTRUFF C A, EASTGATE M D, BARAN P S. Natural product synthesis in the age of scalability[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(4): 419-432.
- [4] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 200-216.
- [5] LI J, AMATUNI A, RENATA H. Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of bioactive natural products[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55: 111-118.
- [6] SIMIĆ S, ZUKIĆ E, SCHMERMUND L, et al. Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(1): 1052-1126.
- [7] CHAKRABARTY S, ROMERO E O, PYSER J B, et al. Chemoenzymatic total synthesis of natural products[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(6): 1374-1384.
- [8] ABRAMS D J, PROVENCHER P A, SORENSEN E J. Recent applications of C—H functionalization in complex natural product synthesis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(23): 8925-8967.
- [9] SINHA S K, GHOSH P, JAIN S, et al. Transition-metal catalyzed C—H activation as a means of synthesizing complex natural products[J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(21): 7461-7503.
- [10] LI F Z, ZHANG X, RENATA H. Enzymatic C—H functionalizations for natural product synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 25-32.
- [11] TURNER N J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(8): 567-573.
- [12] PACKER M S, LIU D R. Methods for the directed evolution of proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(7): 379-394.
- [13] DENISOV I G, MAKRIS T M, SLIGAR S G, et al. Structure and chemistry of cytochrome P450[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(6): 2253-2278.
- [14] GUENGERICH F P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14(6): 611-650.
- [15] 蒋媛媛, 李盛英. 细胞色素P450酶在生物合成及有机合成中的催化功能及其应用[J]. *有机化学*, 2018, 38(9): 2307-2323.
- JIANG Y Y, LI S Y. Catalytic function and application of cytochrome P450 enzymes in biosynthesis and organic synthesis[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2018, 38(9): 2307-2323.
- [16] FESSNER N D. P450 monooxygenases enable rapid late-stage diversification of natural products via C—H bond activation [J]. *ChemCatChem*, 2019, 11(9): 2226-2242.
- [17] XIONG L B, LIU H H, ZHAO M, et al. Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of kasB in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 80.
- [18] ZHENG M M, LIN Z, LIN S J, et al. Chemoenzymatic synthesis of steroidal products: recent advances[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2024: e202301066.
- [19] ZHANG X D, PENG Y Q, ZHAO J, et al. Bacterial cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective steroid hydroxylation enabled by directed evolution and rational design [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2020, 7(1): 2.
- [20] RENATA H, ZHOU Q H, BARAN P S. Strategic redox relay enables a scalable synthesis of ouabagenin, a bioactive cardenolide[J]. *Science*, 2013, 339(6115): 59-63.
- [21] RENATA H, ZHOU Q H, DÜNSTL G, et al. Development of a concise synthesis of ouabagenin and hydroxylated corticosteroid analogues[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(3): 1330-1340.
- [22] WOLFF M E, MORIOKA T. C-19 functional steroids. X. 17 β -hydroxy-1 β ,19-cyclo-5 α -androstan-2-one and related compounds[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1965, 30: 2553-2557.
- [23] WANG Y, JU W, TIAN H L, et al. Scalable synthesis of cyclocitronin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(30): 9413-9416.
- [24] CLARK T A, CHONG R, MADDOX I S. An investigation into the 19-hydroxylation of androstenedione, cortexolone and progesterone by selected fungi[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 21(1): 132-134.
- [25] WANG J L, ZHANG Y N, LIU H H, et al. A biocatalytic hydroxylation-enabled unified approach to C19-hydroxylated steroids[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3378.
- [26] PRASSAS I, DIAMANDIS E P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(11): 926-935.
- [27] DU J, JIANG L J, CHEN F Q, et al. Cardiac glycoside ouabain exerts anticancer activity via downregulation of STAT3[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 684316.
- [28] ZEITLIN P L, DIENER-WEST M, CALLAHAN K A, et al. Digitoxin for airway inflammation in cystic fibrosis: preliminary assessment of safety, pharmacokinetics, and dose finding[J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2017, 14(2): 220-229.
- [29] RIJSBERGEN M, NIEMEYER-VAN DER KOLK T, HOGENDOORN G, et al. A randomized controlled proof-of-concept trial of digoxin and furosemide in adults with cutaneous warts[J]. *British Journal of Dermatology*, 2019, 180(5): 1058-1068.
- [30] FEJEDELEM Z, CARNEY N, NAGORNY P. Synthesis of cardiotonic steroids oleandrigenin and rhodexin B[J]. *The*

- Journal of Organic Chemistry, 2021, 86(15): 10249-10262.
- [31] KHATRI H R, BHATTARAI B, KAPLAN W, et al. Modular total synthesis and cell-based anticancer activity evaluation of ouabagenin and other cardiotonic steroids with varying degrees of oxygenation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(12): 4849-4860.
- [32] SHIMIZU S, HAGIWARA K, ITOH H, et al. Unified total synthesis of five bufadienolides[J]. Organic Letters, 2020, 22(21): 8652-8657.
- [33] ZHAO Y, ZHANG B, SUN Z, et al. Biocatalytic C14-hydroxylation on androstenedione enabled modular synthesis of cardiotonic steroids[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(16): 9839-9845.
- [34] SONG F Z, ZHENG M M, WANG J L, et al. Chemoenzymatic synthesis of C14-functionalized steroids[J]. Nature Synthesis, 2023, 2: 729-739.
- [35] YARROW J F, MCCOY S C, BORST S E. Tissue selectivity and potential clinical applications of trenbolone (17 β -hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one): a potent anabolic steroid with reduced androgenic and estrogenic activity[J]. Steroids, 2010, 75(6): 377-389.
- [36] 张沪跃, 陈燕, 施蛟, 等. 高收率合成醋酸群勃龙[J]. 复旦学报(医学版), 2002, 29(3): 211-212.
ZHANG H Y, CHEN Y, SHI J, et al. Synthesis of trenbolone acetate in high yield[J]. Fudan University Journal of Medical Science, 2002, 29(3): 211-212.
- [37] LI A T, ACEVEDO-ROCHA C G, D'AMORE L, et al. Regio- and stereoselective steroid hydroxylation at C7 by cytochrome P450 monooxygenase mutants[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(30): 12499-12505.
- [38] PENG Y Q, GAO C H, ZHANG Z L, et al. A chemoenzymatic strategy for the synthesis of steroid drugs enabled by P450 monooxygenase-mediated steroidal core modification[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(5): 2907-2914.
- [39] LI C, QIU W W, YANG Z F, et al. Stereoselective synthesis of some methyl-substituted steroid hormones and their *in vitro* cytotoxic activity against human gastric cancer cell line MGC-803[J]. Steroids, 2010, 75(12): 859-869.
- [40] ZHANG Z L, GAO C H, ZHAO J, et al. A designed chemoenzymatic route for efficient synthesis of 6-dehydronandrolone acetate: a key precursor in the synthesis of C7-functionalized steroidal drugs[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(19): 13111-13116.
- [41] CHEN Q B, XIN X L, YANG Y, et al. Highly conjugated norditerpenoid and pyrroloquinoline alkaloids with potent PTP1B inhibitory activity from *Nigella glandulifera*[J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(4): 807-812.
- [42] ZHANG S, ZHANG Z Y. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(9-10): 373-381.
- [43] LOSKOT S A, ROMNEY D K, ARNOLD F H, et al. Enantioselective total synthesis of nigelladine A *via* late-stage C—H oxidation enabled by an engineered P450 enzyme[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(30): 10196-10199.
- [44] BRUNO N C, TUDGE M T, BUCHWALD S L. Design and preparation of new palladium precatalysts for C—C and C—N cross-coupling reactions[J]. Chemical Science, 2013, 4: 916-920.
- [45] LEWIS J C, MANTOVANI S M, FU Y, et al. Combinatorial alanine substitution enables rapid optimization of cytochrome P450BM3 for selective hydroxylation of large substrates[J]. ChemBioChem, 2010, 11(18): 2502-2505.
- [46] SUNAZUKA T, ŌMURA S. Total synthesis of α -pyrone meroterpenoids, novel bioactive microbial metabolites[J]. Chemical Reviews, 2005, 105(12): 4559-4580.
- [47] COREY E J, NOE M C, LIN S Z. A mechanistically designed bis-cinchona alkaloid ligand allows position- and enantioselective dihydroxylation of farnesol and other oligoprenyl derivatives at the terminal isopropylidene unit[J]. Tetrahedron Letters, 1995, 36(48): 8741-8744.
- [48] KUMANIRENG A S, KATO T, KITAHARA Y. Cyclization of polyenes X. Biogenetic type synthesis of dl-taondiol[J]. Chemistry Letters, 1973, 2(10): 1045-1047.
- [49] ABAD A, AGULLÓ C, ARNÓ M, et al. An efficient stereoselective synthesis of stypodiol and epistypodiol[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1998, 63(15): 5100-5106.
- [50] TAKIKAWA H, IMAMURA Y, SASAKI M. Synthesis and absolute configuration of brevione B, an allelochemical isolated from *Penicillium* sp[J]. Tetrahedron, 2006, 62(1): 39-48.
- [51] LI J, LI F Z, KING-SMITH E, et al. Merging chemoenzymatic and radical-based retrosynthetic logic for rapid and modular synthesis of oxidized meroterpenoids[J]. Nature Chemistry, 2020, 12: 173-179.
- [52] EVERSON D A, SHRESTHA R, WEIX D J. Nickel-catalyzed reductive cross-coupling of aryl halides with alkyl halides[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(3): 920-921.
- [53] ANADA M, HANARI T, KAKITA K, et al. Total synthesis of brasilicardins A and C[J]. Organic Letters, 2017, 19(20): 5581-5584.
- [54] BOYKO Y D, HUCK C J, NING S, et al. Synthetic studies on selective, proapoptotic isomalabaricane triterpenoids aided by computational techniques[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(4): 2138-2155.
- [55] BOYKO Y D, HUCK C J, SARLAH D. Total synthesis of isomalabaricane triterpenoids[J]. Journal of the American

- Chemical Society, 2019, 141(36): 14131-14135.
- [56] POWERS Z, SCHARF A, CHENG A, et al. Biomimetic synthesis of meroterpenoids by dearomatization-driven polycyclization[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(45): 16141-16146.
- [57] YOSHIMURA F, ITOH R, TORIZUKA M, et al. Asymmetric total synthesis of brasilicardins[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(52): 17161-17167.
- [58] MITSUHASHI T, BARRA L, POWERS Z, et al. Exploiting the potential of meroterpenoid cyclases to expand the chemical space of fungal meroterpenoids[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(52): 23772-23781.
- [59] VAN TAMELEN E E, SHARPLESS K B, HANZLIK R P, et al. Enzymic cyclization of *trans, trans, trans*-18,19-dehydrosqualene 2,3-oxide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1967, 89(26): 7150-7151.
- [60] LI F Z, RENATA H. A Chiral-pool-based strategy to access *trans-syn*-fused drimane meroterpenoids: chemoenzymatic total syntheses of polysin, *N*-acetyl-polyveoline and the chrodrimanins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(43): 18280-18286.
- [61] KILLE S, ZILLY F E, ACEVEDO J P, et al. Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution[J]. *Nature Chemistry*, 2011, 3(9): 738-743.
- [62] SMITH A B, VISNICK M, HASELTINE J N, et al. Organometallic reagents in synthesis: a new protocol for construction of the indole nucleus[J]. *Tetrahedron*, 1986, 42(11): 2957-2969.
- [63] FIER P S, MALONEY K M. Synthesis of complex phenols enabled by a rationally designed hydroxide surrogate[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(16): 4478-4482.
- [64] FU S M, LIU B. Recent progress in the synthesis of limonoids and limonoid-like natural products[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2020, 7(14): 1903-1947.
- [65] BRANDT G E L, SCHMIDT M D, PRISINZANO T E, et al. Gedunin, a novel Hsp90 inhibitor: semisynthesis of derivatives and preliminary structure-activity relationships[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(20): 6495-6502.
- [66] ENGLISH A W, LIU K, NICOLINI J M, et al. Small-molecule trkB agonists promote axon regeneration in cut peripheral nerves[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(40): 16217-16222.
- [67] GORANTLA N V, DAS R, CHIDAMBARAM H, et al. Basic limonoid modulates chaperone-mediated proteostasis and dissolve Tau fibrils[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4023.
- [68] BEHENNA D C, COREY E J. Simple enantioselective approach to synthetic limonoids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(21): 6720-6721.
- [69] COREY E J, HAHN R W. Synthesis of a limonoid, azadiradione[J]. *Tetrahedron Letters*, 1989, 30(23): 3023-3026.
- [70] YAMASHITA S, NARUKO A, NAKAZAWA Y, et al. Total synthesis of limonin[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(29): 8538-8541.
- [71] LI J, CHEN F, RENATA H. Concise chemoenzymatic synthesis of gedunin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(42): 19238-19242.
- [72] FENG J J, GARZA V J, KRISCHE M J. Redox-triggered C—C coupling of alcohols and vinyl epoxides: diastereo- and enantioselective formation of all-carbon quaternary centers *via tert*-(hydroxy)-prenylation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(25): 8911-8914.
- [73] BRILL Z G, CONDAKES M L, TING C P, et al. Navigating the chiral pool in the total synthesis of complex terpene natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(18): 11753-11795.
- [74] LI F Z, DENG H P, RENATA H. Remote B-ring oxidation of sclareol with an engineered P450 facilitates divergent access to complex terpenoids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(17): 7616-7621.
- [75] ZHANG W, YAO H L, YU J X, et al. Total syntheses of sesterterpenoid ansellones A and B, and phorbadiene[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(17): 4787-4791.
- [76] HE H B, JIANG H, CHEN Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2550.
- [77] LIAO Y J, BAI H Y, LI Z H, et al. Longikaurin A, a natural *ent*-kaurane, induces G2/M phase arrest *via* downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2014, 5(3): e1137.
- [78] HONG Y J, TANTILLO D J. Formation of beyerene, kaurene, trachylobane, and atiserene diterpenes by rearrangements that avoid secondary carbocations[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(15): 5375-5386.
- [79] LAZARSKI K E, MORITZ B J, THOMSON R J. The total synthesis of *Isodon* diterpenes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(40): 10588-10599.
- [80] RIEHL P S, DEPORRE Y C, ARMALY A M, et al. New avenues for the synthesis of *ent*-kaurene diterpenoids[J]. *Tetrahedron*, 2015, 71(38): 6629-6650.
- [81] CHERNEY E C, LOPCHUK J M, GREEN J C, et al. A unified approach to *ent*-atisane diterpenes and related alkaloids: synthesis of (–)-methyl atisenoate, (–)-isoatisine, and the hetidine skeleton[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(36): 12592-12595.
- [82] KENNY M J, MANDER L N, SETHI S P. Synthetic studies on

- rabdosia diterpene lactones II: the synthesis of 15-desoxyeffusin[J]. *Tetrahedron Letters*, 1986, 27(33): 3927-3930.
- [82] KOBAYASHI S, SHIBUKAWA K, HAMADA Y, et al. Syntheses of (–)-tripterifordin and (–)-neotripterifordin from stevioside[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2018, 83(3): 1606-1613.
- [83] DONG L B, ZHANG X, RUDOLF J D, et al. Cryptic and stereospecific hydroxylation, oxidation, and reduction in platensimycin and platencin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(9): 4043-4050.
- [84] RUDOLF J D, DONG L B, ZHANG X, et al. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation initiating ether formation in platensimycin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(39): 12349-12353.
- [85] ZHANG X, KING-SMITH E, DONG L B, et al. Divergent synthesis of complex diterpenes through a hybrid oxidative approach[J]. *Science*, 2020, 369(6505): 799-806.
- [86] OISHI H, HOSOKAWA T, OKUTOMI T, et al. Pesticidal activity of aureothin[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1969, 33(12): 1790-1791.
- [87] JACOBSEN M F, MOSES J E, ADLINGTON R M, et al. A short total synthesis of aureothin and *N*-acetylaureothamine[J]. *Organic Letters*, 2005, 7(4): 641-644.
- [88] LIANG G X, SEIPLE I B, TRAUNER D. Stereoselective syntheses of the bioactive polypropionates aureothin, *N*-acetylaureothamine, and aureonitrile[J]. *Organic Letters*, 2005, 7(14): 2837-2839.
- [89] ISHIBASHI Y, OHBA S, NISHIYAMA S, et al. Absolute configuration of (+)-aureothin: a toxic metabolite possessing γ -pyrone unit[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1995, 68(12): 3643-3649.
- [90] HE J, HERTWECK C. Biosynthetic origin of the rare nitroaryl moiety of the polyketide antibiotic aureothin: involvement of an unprecedented *N*-oxygenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(12): 3694-3695.
- [91] HE J, MÜLLER M, HERTWECK C. Formation of the aureothin tetrahydrofuran ring by a bifunctional cytochrome P450 monooxygenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(51): 16742-16743.
- [92] RICHTER M E, TRAITCHEVA N, KNÜPFER U, et al. Sequential asymmetric polyketide heterocyclization catalyzed by a single cytochrome P450 monooxygenase (*AurH*) [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(46): 8872-8875.
- [93] WERNEBURG M, HERTWECK C. Chemoenzymatic total synthesis of the antiproliferative polyketide (+)-(*R*)-aureothin [J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(13): 2064-2066.
- [94] HENROT M, RICHTER M E A, MADDALUNO J, et al. Convergent asymmetric synthesis of (+)-aureothin employing an oxygenase-mediated resolution step[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(38): 9587-9591.
- [95] LEVINE D P. Vancomycin: a history[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(Suppl 1): S5-S12.
- [96] SHUGRUE C R, MILLER S J. Applications of nonenzymatic catalysts to the alteration of natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(18): 11894-11951.
- [97] HUBBARD B K, WALSH C T. Vancomycin assembly: nature's way[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42(7): 730-765.
- [98] HUBBARD B K, WALSH C T. Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur[J]. *Angewandte Chemie*, 2003, 115(7): 752-789.
- [99] OKANO A, ISLEY N A, BOGER D L. Total syntheses of vancomycin-related glycopeptide antibiotics and key analogues [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(18): 11952-11993.
- [100] STEGMANN E, PELZER S, BISCHOFF D, et al. Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(4): 640-653.
- [101] FORNERIS C C, SEYEDSAYAMDOST M R. *In vitro* reconstitution of OxyC activity enables total chemoenzymatic syntheses of vancomycin aglycone variants[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(27): 8048-8052.
- [102] HAUSER N, IRELAND K A, CHIOTI V T, et al. Robust chemoenzymatic synthesis of keratinimicin aglycone analogues facilitated by the structure and selectivity of OxyB [J]. *ACS Chemical Biology*, 2023, 18(7): 1473-1479.
- [103] LOWELL A N, DEMARS M D II, SLOCUM S T, et al. Chemoenzymatic total synthesis and structural diversification of tylactone-based macrolide antibiotics through late-stage polyketide assembly, tailoring, and C—H functionalization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(23): 7913-7920.
- [104] CHAGANTY S, GOLAKOTI T, HELTZEL C, et al. Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(8): 1403-1406.
- [105] SMITH C D, ZHANG X Q, MOOBERRY S L, et al. Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells[J]. *Cancer Research*, 1994, 54(14): 3779-3784.
- [106] EDELMAN M J, GANDARA D R, HAUSNER P, et al. Phase 2 study of cryptophycin 52 (LY355703) in patients previously treated with platinum based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2003, 39(2): 197-199.
- [107] MAGARVEY N A, BECK Z Q, GOLAKOTI T, et al. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from *Nostoc* cyanobionts[J]. *ACS Chemical Biology*, 2006, 1(12): 766-779.
- [108] SUN H H, ZHANG H F, ANG E L, et al. Biocatalysis for the

- synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, 26(7): 1275-1284.
- [110] YANG Y, ARNOLD F H. Navigating the unnatural reaction space: directed evolution of heme proteins for selective carbene and nitrene transfer[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(5): 1209-1225.
- [111] ZHOU Q, CHIN M, FU Y, et al. Stereodivergent atom-transfer radical cyclization by engineered cytochromes P450[J]. *Science*, 2021, 374(6575): 1612-1616.
- [112] MILLER D C, ATHAVALE S V, ARNOLD F H. Combining chemistry and protein engineering for new-to-nature biocatalysis[J]. *Nature Synthesis*, 2022, 1(1): 18-23.
- [113] 杨谦, 程伯涛, 汤志军, 等. 基因组挖掘在天然产物发现中的应用和前景[J]. *合成生物学*, 2021, 2(5): 697-715.
- YANG Q, CHENG B T, TANG Z J, et al. Applications and prospects of genome mining in the discovery of natural products[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(5): 697-715.
- [114] WU Z, JENNIFER KAN S B J, LEWIS R D, et al. Machine learning-assisted directed protein evolution with combinatorial libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(18): 8852-8858.
- [115] JACQUES P, BÉCHET M, BIGAN M, et al. High-throughput strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(2): 161-180.
- [116] KING-SMITH E, FABER F A, REILLY U, et al. Predictive Minisci late stage functionalization with transfer learning[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 426.
- [117] FINNIGAN W, LUBBERINK M, HEPWORTH L J, et al. RetroBioCat database: a platform for collaborative curation and automated meta-analysis of biocatalysis data[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(17): 11771-11780.



通讯作者: 李付璋(1990—),男,青年研究员,博士生导师。研究方向为酶催化反应开发,活性天然产物化学-酶法合成等。

E-mail: lifuzhuo@fudan.edu.cn



第一作者: 程中玉(1998—),男,研究助理。研究方向为活性天然产物化学-酶法合成。

E-mail: zhongyu_cheng@fudan.edu.cn