

紫杉醇合成研究综述与展望

蔡长春¹,冯吉¹,程玲¹,饶雄飞¹,张剑锋^{2*}

¹湖北省烟草科学研究院,武汉 430030;²中国烟草总公司郑州烟草研究院,郑州 450001

摘要:紫杉醇(taxol)是迄今为止全球开发最成功的植物类抗癌药物之一。本文主要介绍了紫杉醇的药理作用及四种主要合成途径,包括直接提取、化学全合成、化学半合成以及生物合成,着重展望了利用烟草叶绿体基因工程开拓一条低成本、高质量、可持续获取紫杉醇的生物合成途径,这是紫杉醇生物医药产业未来发展希望。

关键词:紫杉醇;抗癌药物;合成途径;烟草叶绿体基因工程;生物合成

中图分类号:R914;R284.3

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0155-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.023

Research progress and prospects on synthesis of taxol

CAI Chang-chun¹, FENG Ji¹, CHENG Ling¹, RAO Xiong-fei¹, ZHANG Jian-feng^{2*}

¹Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, China;

²Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Taxol is one of the most successfully developed anticancer drugs originated from plants in the world. Its pharmacological activities and four synthesis pathways including direct extraction from *Taxus* spp., total chemical synthesis, semi-chemical synthesis and biosynthesis were reviewed in this paper. Among them, the biosynthesis pathway of taxol by using tobacco chloroplast genetic engineering (TCGE) was especially highlighted based on its low cost, high quality and being sustainably obtained, which can provide the most important development value for bio-pharmaceutical industry of taxol.

Key words: taxol; anticancer drugs; synthesis pathway; tobacco chloroplast genetic engineering (TCGE); biosynthesis

紫杉醇(paclitaxel,商品名 taxol)是红豆杉科红豆杉属(*Taxus* spp.)植物及其内生真菌产生的一种具有复杂结构的二萜类次生代谢产物^[1],20世纪60年代被科学家发现其具有抗癌作用^[2],是世界上第一个被发现对微管蛋白聚合有促进作用的天然产物^[3],也是迄今为止开发最成功的植物抗癌药物之一,已成为全球医药科学研究和产业化开发长盛不衰的热点^[4]。1992年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准了紫杉醇上市,它成为了治疗乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌等恶性肿瘤的一线临床药物^[3],具有广阔的市场需求和巨大的市场价值。据统计,2020年全球紫杉醇原料药市场规模约为1.27亿美元,预期到2026年增至1.9亿~2.0亿美元,总产量将比2020年增加超过2000 kg^[5]。由于从红豆杉属植物中直接提取的生产途径对植物自然资源

会带来严重威胁^[6],1999年,我国将红豆杉属所有种列为国家一级保护植物,并对紫杉醇、红豆杉及其所有制品均实施进出口证明管理,国内紫杉醇生产企业也被纳入严格管理行列,加拿大、美国等红豆杉主要分布国家也通过立法加强了保护^[7]。为了摆脱生产紫杉醇对红豆杉属植物自然资源的依赖和束缚,全球研究人员先后开发出除直接提取法^[6]之外的化学全合成法^[8-21]、化学半合成法^[22-28]、生物合成法^[29-33]等,其中利用紫杉醇前体物如10-去乙酰巴卡亭-III(10-deacetylbaccatin III,10-DAB III;又名10-浆果赤酶碱)合成紫杉醇或同系物等的半合成法是现阶段扩大紫杉醇来源的有效途径^[25,26],而生物合成法虽然尚有诸多技术难关有待攻破^[27-30],但被认为代表了未来紫杉醇规模化生产的高效途径,产业价值较大,应用前景广阔。

1 紫杉醇的药用价值

近代临床及药理学研究表明,紫杉醇是一种具备高抗癌活性的天然产物,能独特性地促进细胞微

收稿日期:2022-02-22

接受日期:2022-03-22

基金项目:中国烟草总公司重点科技项目(110202101008(JY-08))

*通信作者 Tel:86-013783672530;E-mail:zhangjianfeng@outlook.com

管蛋白聚合,防止其解聚^[3],从而抑制细胞有丝分裂进程阻止癌细胞增殖,最终达到阻止癌症继续恶化的目的,使细胞分裂止步于G2(the second gap)期或M(metaphase)期^[34],另外,紫杉醇也能作用于巨噬细胞上的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体,促使其释放白细胞介素和干扰素,对肿瘤细胞起杀伤或抑制作用,主要对卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌有显著疗效,同时对食道癌、头颈部癌、白血病、黑色素瘤和结肠癌等其他癌症也有一定疗效,但紫杉醇水溶性差(<0.004 mg/mL),临床使用上较为不便,因此,研究人员开展了紫杉醇新型剂设计工作以提高药效、降低不良反应的研究,比如紫杉醇药物释放支架和白蛋白纳米粒注射用等,它们相继被FDA批准上市,是紫杉醇新型制剂研究的成果例证^[35,36]。由于紫杉醇出色的抗癌疗效,目前已获得了全球多个国家、地区的批准用于临床癌症治疗,其紫杉醇及同系物紫杉烯醇也已成为史上销量最大的抗癌药物。

除紫杉醇之外,紫杉醇其他同系物如多西紫杉醇(docetaxel,商品名taxotere),制剂被称为“泰素帝”或“多西他赛”、卡巴他赛(cabazitaxel,商品名jevtana)等对个别癌症也有较好疗效,在临床上也被广泛使用^[37,38]。

2 紫杉醇的合成途径

2.1 直接提取

1965年,美国科学家Wall和Wani首次从太平洋紫杉(又叫短叶红豆杉)树皮和木材中分离得到了具有抗癌作用的有效成分,并据此将其命名为紫杉醇^[2]。然而,植物体内的紫杉醇含量极低,即使目前公认含量最高的太平洋紫杉树皮中紫杉醇含量也仅为0.069%,树叶、果实等组织中含量更低,最低含量仅有0.003%,相当于每提取1kg的紫杉醇大约需要活剥10000kg树皮,而且红豆杉生长极其缓慢,资源极度匮乏。长期以来全球紫杉醇供需矛盾十分突出,导致全红豆杉树木资源一度遭到毁灭性破坏,多国不得已立法予以保护。因此,通过破坏紫杉树直接提取获得紫杉醇的方法不可持续。我国80%的红豆杉分布在滇西横断山脉和四川盆地周边山地^[7],其中云南红豆杉紫杉醇含量最高。目前,随着紫杉醇合成技术的不断发展,对单一地通过红豆杉直接提取紫杉醇的依赖程度大幅降低,红豆杉濒危物种也得到了较好保护。

2.2 化学全合成

1971年,随着分离纯化技术、核磁共振(NMR)、质谱(MS)以及计算机X线断层扫描(X-ray computer tomography)等多种技术的发展与成熟应用,紫杉醇的化学结构得以被揭示^[2]。紫杉醇为四环二萜类化合物,化学分子式是C₄₇H₅₁NO₁₄(见图1),共有11个手性中心,其中母核有9个,侧链有2个,母核中的四个环分别被标记为A、B、C、D,其中A环和C环均为六元碳环,B环为八元碳环,D环为含氧四元环,此外还有11个手性碳,是一个结构相当复杂的天然有机化合物,理论上存在2048个非对映异构体^[12]。紫杉醇为白色或类白色结晶性粉末,易溶于甲醇、乙醇或三氯甲烷,微溶于乙醚,难溶于水。

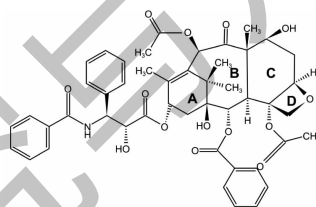


图1 紫杉醇化学结构

Fig. 1 Chemical structure of taxol

由于紫杉醇巨大的商业价值以及全合成科学所带来的挑战,全世界有40多个一流科研团队开始了紫杉醇的全合成研究,其中有6个团队成功完成并发表了他们的研究成果^[9,12,15,16,18,21]。全合成战略主要分两种:一是线性战略,即由A环到ABC环或者由C环到ABC环,再由ABC环到ABCD环;二是会聚战略,即由A环、B环和C环先会聚合成ABC环,再结合D环形成ABCD环,或者由A环和C环先会聚合成AC环,再结合D环形成ADC环,最后结合B环形成ABCD环,或者先由B环结合C环形成BC环,再结合A环形成ABC环,最后结合D环形成ABCD环。其核心战略思路是:在得到含有紫杉醇母核结构的巴卡亭III后,再通过酰化反应引入侧链从而完成紫杉醇的全合成。其中Holton^[9]和Nicolaou^[12]选择了线性战略,Danishefsky^[15]、Wender^[16]和Morihiro^[18]选择了会聚战略,Mukaiyama^[21]选择了线性和会聚两种战略的结合。

总体上看,紫杉醇全合成技术路线存在过程太长、步骤太多、可控性较难、产率较低(最高不超过2%)以及成本较高等不足,短期内难以形成以全合成战略为主体的工业规模化生产,但紫杉醇化学全

合成方法的研究将天然有机合成化学提高到了一个崭新水平,学术贡献巨大^[8]。

2.3 化学半合成

国际市场上紫杉醇原料药按来源可分为天然紫杉醇和半合成紫杉醇,前者为红豆杉树皮提取物,或红豆杉树皮细胞培养液提取的天然紫杉醇,后者为红豆杉枝叶提取物(主要是 10-DAB III)经过半合成而成的原料药^[5],因此,化学半合成法是目前紫杉醇及其类似物的主要获得途径之一。

目前化学半合成法主要包括两种方法:一是以 10-DAB III 为前体,经过选择性保护(羟基保护)、与侧链缩合、脱保护和开环后得到紫杉醇及其衍生物,10-DAB III 在红豆杉枝叶中的含量可以达到 1%,原料有保障;二是以 10-去乙酰基紫杉醇为前体,经过乙酰化后得到紫杉醇及其衍生物,但是 10-乙酰基紫杉醇也需要从红豆杉的树皮或树叶中提取,含量较低,产量有限,因此,主要采用前一种方法。

红豆杉的枝叶中含有较丰富的紫杉醇前体化合物 10-DAB III 和巴卡亭 III(约千分之一),这两种化合物均具备了紫杉醇的母核结构与多个手性中心。

1988 年,法国安万特制药公司率先开发出利用从欧洲红豆杉枝叶中提取的 10-DAB III 为起始原料半合成紫杉醇的同系物多西紫杉醇(多西他赛)途径,红豆杉枝叶属可再生资源,这一新工业随后被众多药企采用^[23]。随着化学半合成技术的日益成熟,全球半合成紫杉醇原料药产量迅速上升,2000 年以前,全球紫杉醇原料药年产量仅为 500 kg 左右,2010 年,全球紫杉醇原料药总产量首次突破 1000

kg 大关,至 2017 年增至 2 600 kg,2020 年已达 3 200 ~ 3 400 kg^[5]。

化学半合成的大致思路为:经三乙基硅醇 C7 位上的羟基进行保护后,然后经四元环侧链供体与母核 C13 位羟基对接,再经脱去保护基团获得紫杉醇,由此实现紫杉醇的商业化。这一开创性的化学半合成路径设计确立了“对接式”的合成思路^[39],此后紫杉醇衍生物的化学半合成依然延续这条思路。该思路的核心是:“对接母核与侧链缩合”+“保护与去保护”。另外,通过对紫杉醇侧链的修饰可以获得活性或成药性更优于紫杉醇的类似物。例如,将紫杉醇 C13 侧链中的苯基用叔丁氧基取代可以获得新的抗肿瘤药物“多西他赛”,该药物的抗肿瘤活性是紫杉醇的 10 倍,而且亲水性更好,毒副作用更小。经过不断优化,目前从 10-DAB III 到多西他赛的产率已经超过了 70%^[12,30]。

化学半合成法主要采用直链侧链法、四元环侧链法和五元环侧链法等三种方法。

(1)直链侧链法:Ojima 等^[23]从欧洲紫杉中分离得到 10-DAB III,并成功合成紫杉醇。这是首次用于化学半合成紫杉醇和多烯杉醇的方法^[24],被保护后的母核与直链侧链链接并酯化后得到紫杉醇前体,并在酸性条件下脱保护基得到紫杉醇或其衍生物(见图 2),为后续紫杉醇化学半合成提供了研究范本。本方法的优点是直链侧链本身化学性质稳定,合成较为容易,缺点是反应条件苛刻,转化率低(不足 50%),分离纯化较为困难。

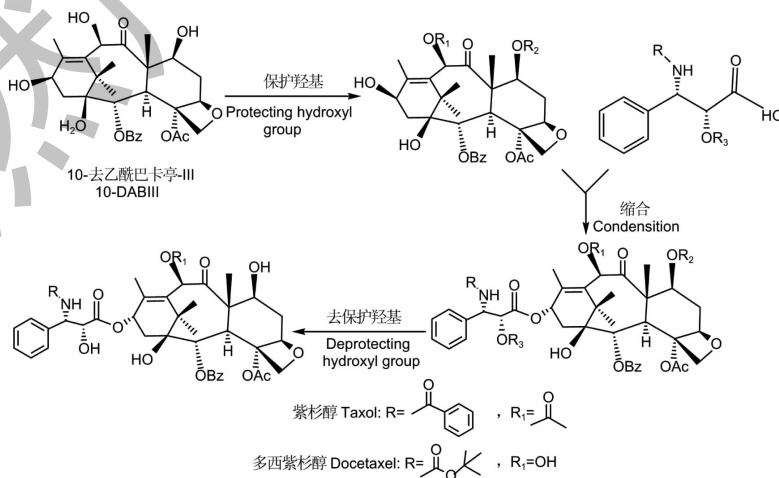


图 2 紫杉醇及其衍生物的直链合成路线

Fig. 2 Synthetic route of taxol and docetaxel using linear synthon

(2) 四元环侧链法。1992年,由百时美施贵宝公司(BMS)与 Holton 教授合作研发成功^[40]。该方法是在改进“直链侧链法”不足而发展起来的有效方法之一。其中与保护的 10-DAB III 要发生酯化反

应(加侧链共通反应)时要开环,反应较容易进行,但往往会产生一定量的 C-2' 差向异构体,而且也需要在较为严苛的条件下进行侧链与母核的耦合,有较大的操作难度(见图 3)。

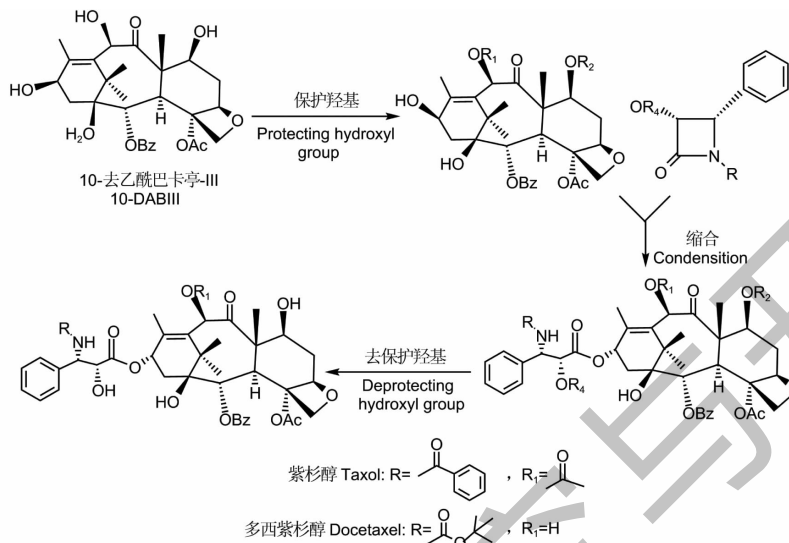


图 3 紫杉醇及其生物的四元环合成路线

Fig. 3 Synthetic route of taxol and docetaxel using β -lactam synthon

(3) 五元环(噁唑环)侧链法:1994年,Kingston 等^[26]首次用噁唑啉与母核发生酯化反应合成了紫杉醇,这也是为改进“直链侧链法”不足而发展起来的方法。手性氨基和羟基通过取代基的成环有效的

保护起来,得到的噁唑环更稳定,而游离出来的羟基位阻降低,能直接参与 10-DAB III 的酯化反应,经过开环、脱保护后得到紫杉醇及其衍生物(见图 4)。

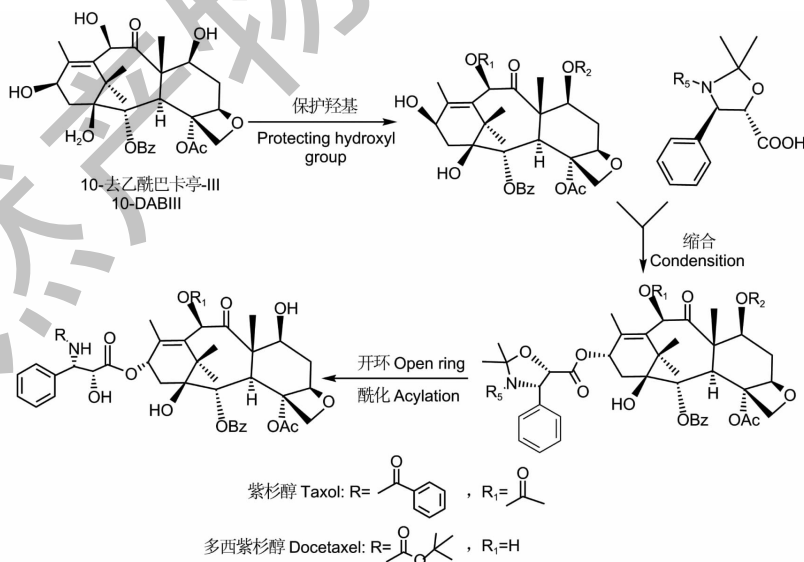


图 4 紫杉醇及其生物噁唑烷环法合成路线

Fig. 4 Synthetic route of taxol and docetaxel using oxazole synthon

另外,研究人员开发了紫杉醇的衍生物卡巴他赛的半合成方法。其合成关键是 C7、C10 位上的甲

基缩合、开环最终得到卡巴他赛,1998年, Bouchard 等^[27]以 10-DAB III 为起始原料,用三乙基氯硅烷对

C7 位上的羟基进行保护后,与碘甲烷反应生成 7-甲氧基-10-DAB III,在氢氟酸和三乙胺的作用下脱去 C7 位的保护,再与碘甲烷反应,生成 7,10-甲氧基-10-DAB III,接着与侧链缩合、开环得到卡巴他赛,该工艺路线分步引入甲氧基,比较繁琐,且用到氢氟酸,给工业化带来不便。2013 年,Rampalli 等^[28]以硫酸二甲酯或碘甲烷直接与 10-DAB III 双甲基化,与四元环侧链缩合,在甲基苯磺酸催化下开环,得到卡巴他赛,但该路线中使用了剧毒试剂硫酸二甲酯,安全和环保压力巨大。2015 年,Luo^[41]以碘甲烷作为甲基化试剂,通过三步反应得到了卡巴他赛,双甲基化的母核与多烯紫杉醇侧链在温和的条件下缩合、开环、酯化得到卡巴他赛,但 C7、C10 位甲基化这一步收率偏低(<40%)。

综上所述,紫杉醇的化学半合成方法是用相对易得的 10-DAB III 与侧链缩合得到成品,因此,高效合成具有光学活性的紫杉醇侧链一直以来都是学术界和工业界的研究热点。

2.4 生物合成

20 世纪 90 年代末开始,为摆脱紫杉醇生产对红豆杉植物资源的严重依赖,研究人员寻求利用生物工程来合成紫杉醇,试图探索出一条低成本、绿色化、规模化生产紫杉醇的途径。理论上,该方法成本低,易于大规模生产,应用前景十分广阔。

2.4.1 紫杉醇生物合成的理论途径

主要分成 3 个阶段:紫杉烷碳环的合成及官能团化反应、苯异丝氨酸侧链的合成以及侧链和紫杉烷碳环的酯化反应^[30,42-48],由牻牛儿基牻牛儿焦磷酸酯(geranylgeranyl pyrophosphat, GGPP)开始到最后获得紫杉醇,共包括 19 步酶催化反应,涉及 9 种 P450 酶,目前其中仍有 4 种有待发现和鉴定^[46,49]。

紫杉醇生物合成的 3 个阶段简述如下:首先,异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和焦磷酸金合欢酯(farnesyl pyrophosphate, FPP)在 GGPP 合成酶(geranylgeranyl bisphosphate synthase, GGPPS)的催化下合成 GGPP。其次,GGPP 在紫杉二烯合成酶(taxa-4(5),11(12)-diene synthase, TS)催化下环化形成紫杉二烯^[50],然后紫杉二烯的 C5 位在细胞色素氧化酶 P450 的催化下发生羟基化反应,得到中间体:紫杉-4(20),11(12)-二烯-5 α -醇,接着该中间体被酰基化,然后该中间体上的 C10、C13、C2、C9、C7 和 C1 位上依次发生羟基化,进而形成氧杂环,最后以乙酰辅酶 A (acetoacetyl coenzyme A,)

CoA 为底物通过酰基化反应生成巴卡亭 III (母核)^[51,52]。另外, α -苯丙氨酸异构化成 β -苯丙氨酸,再与乙酰辅酶 A (CoA) 结合合成苯异丝氨酸侧链。随后,由¹³C-苯丙氨酸侧链-CoA 酰基转移酶将侧链转移到巴卡亭 III 的 C13 位的羟基上形成羟基酯, β -苯丙氨酸的 C2 和 β -氨基分别被羟基化和苯甲酰化,最终形成紫杉醇^[30,45,47,51]。其中 C13 位的侧链是保证紫杉醇具备抗癌活性的关键因素。

2.4.2 大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的生物合成

目标产物是紫杉二烯。大肠埃希菌具有遗传背景清晰、基因组小、代谢通路相对简单以及来源丰富和易培养等优点,比较适合作为生物合成紫杉醇的宿主^[32]。

可将大肠杆菌中紫杉醇的合成途径分成上游模块和下游模块^[53]。上游模块是 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP)合成途径,负责前体 IPP 和焦磷酸二甲基烯丙酯(dimethylallyl diphosph, DMAPP)的合成^[54],下游模块负责 GGPP 和紫杉二烯的合成。通过平衡下游模块的表达,大幅降低抑制大肠杆菌的副产物吡啶的产量,从而提高紫杉二烯的产量(可达 1 g/L)^[53]。

2.4.3 酵母(酿酒酵母)中的生物合成

目标产物是紫杉二烯。酿酒酵母具有丰富的内膜结构,适合 P450 元件的表达,将紫杉醇后续合成所需的两个 P450 元件和一个乙酰转移酶元件导入到酵母中,然后将该酵母菌与能够合成紫杉二烯的大肠杆菌共培养,成功实现了 5 α -乙酰氧基紫杉二烯-10 β -醇的合成^[55]。

尽管经过对 P450 元件在大肠杆菌中的表达进行了持续优化,使得紫杉二烯氧化产物的产量大大提高(可达 570 mg/L),但目标产物紫杉二烯产出仍然不高(仅占氧化产物产量的 16.29%),而且因为紫杉醇的合成途径尚未完全解析,因此目前还没有成功实现紫杉醇的异源生物合成。巴卡亭 III 合成过程中催化 D 环形成和 C9 位羰基化的生物元件如果能被鉴定,那么通过合成 10-DAB III 进而化学半合成多西他赛等紫杉醇类似物的路径就可以顺利走通,真正实现规模量产。

2.4.4 红豆杉细胞培养合成紫杉醇

红豆杉细胞自身能够合成紫杉醇,利用红豆杉细胞培养合成紫杉醇主要通过愈伤组织培养来实现^[31,56],其中外植体、培养基、pH 值、培养方式及培

培养基添加物等是对愈伤组织形成时间、诱导率以及紫杉醇产量等产生重要影响的因素^[57-60]。1991年, Christen 登记了红豆杉组织培养的第一个专利^[61]。目前,德国 PHYTON BIOPHARM 公司是全球最大的利用红豆杉树皮细胞生产天然紫杉醇原料药的厂商,已完全实现了规模化生产,年产量已达 1 000 kg,预计 2021 年产量可达 1 100 kg^[5]。

3 总结与展望

综上,紫杉醇因其显著的抗癌疗效和巨大的商业价值吸引了全世界从事化学合成、生物工程、药理研究等领域的科研人员开展了广泛而深入的研究,同时诸多制药公司和商业资本也蜂拥而至,投入大量资金开发技术、生产紫杉醇药物,以期掌握技术领先和占据市场主导。迄今,紫杉醇生产主要包括四种主要途径,即直接提取、化学全合成、化学半合成、生物合成(包括细胞培养)。直接提取方法简单,但对原始红豆杉植物资源造成严重破坏和威胁,多国不得已通过立法予以强制保护。化学全合成法尽管技术成熟,但反应过程较长且难于控制、性价比较低而无法实现规模化生产。目前,以 10-DAB III 为原料半合成和利用红豆杉细胞培养合成提取紫杉醇类药物是当前全球紫杉醇原料药生产的两种主要途径,各约占一般产能^[5],另外,随着红豆杉快繁技术的成熟,大规模人工种植红豆杉以直接提取紫杉醇也贡献了一小部分产量,有效保护了原始红豆杉植物资源。最后一种就是生物合成,它具有绿色环保、成本低、可规模化的优点,前景十分广阔,但当前面临的主要障碍是紫杉醇整个合成代谢中尚有少数几个酶基因没有被完全鉴定。

当前,合成生物学是近年来兴起的对生命系统和过程进行重新设计和工程化构建与应用的科学,被预测为未来改变世界的十大颠覆性技术之一,也将为天然化合物的规模化生产及新结构的小分子化合物的设计与异源合成提供全新的策略^[39]。烟草作为生物工程的模式植物具有生长周期短、生物量大、对环境要求低、容易遗传转化等优点^[62],因此,以烟草作为天然产物的异源合成宿主开展叶绿体基因工程的合成生物学研究最为成熟,最为广泛^[63]。自从 1988 年 Boynton 等^[64]在单细胞衣藻中首次成功开展叶绿体基因工程以来,诸多利用叶绿体基因工程提高光合效率、改良植物病虫害抗性、异源合成天然化合物等研究大量见诸报道。2014 年,研究人员将来源于拟南芥的 3-酮脂酰-酰基载体蛋白合成

酶 III 基因(*Kas III*)转入到烟草叶绿体基因组后,转基因烟草叶片中软脂酸(16:0)的含量显著提高,硬脂酸(18:0)和油酸(18:1)的含量显著降低^[65]。2016 年,德国马普所的研究人员开发了一种新的合成生物学方法: COSTREL (combinatorial supertransformation of transplastomic recipient lines)。将青蒿酸的完整合成途径基因整合到烟草叶绿体的基因组中,在筛选出的最佳叶绿体转化烟草中,在细胞核 DNA 中再导入一系列可调节物质代谢的其他基因,最终获得了浓度可达 120 mg/kg 的青蒿酸^[66]。

本文作者承担了关于紫杉烯醇在烟草中异源合成的在研省部级科技项目,目标是要获得具备一定产率的紫杉二烯和紫杉烯醇生物反应器材料,为紫杉醇的化学半合成提供中间物质。此前,作者已成功构建了烟草叶绿体转化平台并经多个基因转化得到成功验证,还构建了紫杉二烯合成酶叶绿体表达载体,并在烟草中成功的获得了紫杉二烯产物(尚未公开发表)。然而,目前紫杉醇中间体的异源合成存在着至少三个主要问题,一是产率较低,在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中的紫杉二烯含量不到万分之一,5 α -羟基紫杉二烯含量则更低,需要通过技术改造提升含量;二是目的产物比例低,在紫杉醇前体生物合成的一系列酶促反应中产生了大量的 OCT 和 OCT 异构体,是造成目的产物 5 α -羟基紫杉二烯产率较低的主要原因;三是目前在植物异源表达中,仅合成到 5 α -羟基紫杉二烯这一步。由于紫杉醇的合成途径没有完全解析,目前还不能实现紫杉醇的异源从头生物合成。可喜的是,最近我国科学家解码了红豆杉高质量基因组,揭示了紫杉醇生物合成的遗传基础,为解决该关键科学问题提供了重要理论基石,也为下一步开发绿色环保、可持续生产的紫杉醇合成策略提供了思路^[67]。因此,一旦鉴定出巴卡亭 III 合成过程中催化 D 环形成和 C9 位羰基化的生物元件,那么通过异源生物合成重要的半合成中间体 10-DAB III,再通过化学合成多西他赛等紫杉醇类似物,就有希望缓解紫杉醇及其类似物合成对红豆杉资源的彻底依赖,以较低成本实现这些药物的大量合成,造福亿万癌症患者。

参考文献

- 1 Liu BY, et al. A survey of a new anticancer drug taxol [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 1995, 12(3): 8-14.
- 2 Wani MC, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and

- structure of taxol, a novel and leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325-2327.
- 3 Schiff PB, et al. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol [J]. *Nature*, 1979, 277: 665-667.
- 4 Shi QW, et al. Review and analysis of the research course of taxol [J]. *Med Philos (医学与哲学)*, 2010, 31 (6): 6-8.
- 5 Xu ZK. Analysis on production and prospect of taxol worldwide [J]. *Chin Pharm Inf (中国制药信息)*, 2011, 27 (10): 38-40.
- 6 Zai YJ, et al. Isolation of an endophytic fungus producing baccatinIII from *Taxus wallichiana* var. *mairei* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40: 1297-1302.
- 7 Shi QW, et al. Research and development of natural medicine taxol [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 1997, 9 (3): 102-107.
- 8 Li LG, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2008, 20: 1104-1107.
- 9 Holton RA, et al. First total synthesis of taxol 1: functionalization of the B ring [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 1597-1598.
- 10 Holton RA, et al. First total synthesis of taxol 2: completion of the C and D rings [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 1599-1600.
- 11 Chen QH, et al. Total synthesis of taxol developed by Holton [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2001, 13 (3): 88-95.
- 12 Nicolaou KC, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nature*, 1994, 367: 630-634.
- 13 Nicolaou KC, et al. Total synthesis of taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 624-659.
- 14 Xu L, et al. Total synthesis of taxol developed by Nicolaou [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2001, 21: 493-504.
- 15 Danishefsky SJ, et al. Total synthesis of baccatin III and taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 2843-2859.
- 16 Wender PA, et al. The pinene path to taxanes 5: stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2755-2756.
- 17 Wender PA, et al. The pinene path to taxanes 6: A concise stereocontrolled synthesis of taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2757-2758.
- 18 Morihira K, et al. Enantioselective total synthesis of taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 12980-12981.
- 19 Kusama H, et al. Enantioselective total synthesis of (-)-taxol [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 3811-3820.
- 20 Shiina I, et al. A new method for the synthesis of baccatinIII [J]. *Chem Lett*, 1998, 8: 1-2.
- 21 Mukaiyama T, et al. A symmetric total synthesis of taxol [J]. *Chem Eur J*, 1999, 5: 121-161.
- 22 Deng XM, et al. Semi-synthetic overview of taxol and Its derivatives [J]. *Zhejiang Chem Ind (浙江化工)*, 2018, 49 (5) 1-8.
- 23 Ojima I, et al. New and efficient approached to the semisynthesis of taxol and its C13 synthon analogs by means of β -lactam synthon method [J]. *Tetrahedron*, 1992, 48: 6985-7012.
- 24 Agat CB, et al. A highly efficient synthesis of the C13 side-chain of taxol using Shibasaki's asymmetric Henry reaction [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 3689-3691.
- 25 Yan JQ. Chiral synthesis of the taxol side chain and semisynthesis of taxol [J]. *Fine Special Chem (精细与专用化学品)*, 2005, 18: 1-6.
- 26 Kingston DG, et al. Synthesis of taxol from baccatinIII via an oxazoline intermediate [J]. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35: 4483-4484.
- 27 Bouchard H, et al. Taxoids, their preparation and pharmaceutical compositions containing them: US5847170 [P]. 1998-12-08.
- 28 Rampalli S, et al. Process for preparing amorphous cabazitaxel: US14650296 [P]. 2013-12-18.
- 29 Peng T, et al. Advances in taxol biosynthesis [J]. *World Clinic Drugs (世界临床药物)*, 2015, 36 (3): 197-203.
- 30 Guerra-Bubb J, et al. The early stages of taxol biosynthesis: an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 683-696.
- 31 Ma X, et al. Production of taxol by *Taxus* cell culture [J]. *Chin J Pharm Biotech (药物生物技术)*, 2004, 11: 401-405.
- 32 Zhang JM, et al. Progress in engineering *Escherichia coli* for production of high-value added organic acids and alcohols [J]. *Chin J of Biotech (生物工程学报)*, 2013, 29: 1363-1373.
- 33 Julsing MK, et al. Combinational biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites [J]. *Biomol Eng*, 2006, 23 (6): 265-279.
- 34 Zhao R, et al. Development and current trends on anticancer plant drug, taxol [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2009, 40: 1172-1174.
- 35 Qin ZD, et al. Analysis of paclitaxel research progress [J]. *Bull Sci Technol (科技通报)*, 2018, 34 (4): 15-20.
- 36 Waugh J, et al. The paclitaxel (TAXUS™)-eluting stent: a review of its use in the management of *de novo* coronary artery lesions [J]. *Amer J of Cardiovascular Drugs*, 2004, 4 (4): 257-268.
- 37 Williamson KA, et al. Docetaxel: a review of its use in meta-

- static breast cancer[J]. *Drugs*, 2005, 65:2513-2531.
- 38 Yao HJ. Research progress on taxol and its market analysis [J]. *Chin Pharm Inf (中国制药信息)*, 2001, 17(5):29-30.
- 39 Wang PP, et al. Route to artificially synthesize plant natural products[J]. *Chin J Org Chem(有机化学)*, 2018, 38:2199-2214.
- 40 Dunn PJ, et al. Green chemistry in the pharmaceutical industry [M]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010:145-160.
- 41 Luo H, et al. A new synthetic process of cabazitaxel: CN104292188[P]. 2015-01-21.
- 42 Koksál M, et al. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis [J]. *Nature*, 2011, 469(7328):116-120.
- 43 Kaspera R, et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of taxol oxetane ring D precursors [J]. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51:2017-2019.
- 44 Hampel D, et al. Taxol biosynthesis: Identification and characterization of two acetyl-CoA: taxoid-*O*-acetyl transferases that divert pathway flux away from taxol production[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 487(2):91-97.
- 45 Croteau R, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5(1):75-97.
- 46 Walker K, et al. Taxol biosynthesis genes [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(1):1-7.
- 47 Jennewein S, et al. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(1-2):13-19.
- 48 Gao MB, et al. Advances in the biosynthesis research of taxol and taxanes[J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2010, 45:900-1903.
- 49 Kaspera R, et al. Cytochrome P450 oxygenases of taxol biosynthesis[J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5:433-444.
- 50 Wang YX, et al. Advances of paclitaxel combinatorial biosynthesis in yeast [J]. *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2013, 20:271-275.
- 51 Kong JQ, et al. Recent advances in the biosynthesis of taxol [J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2007, 42:358-365.
- 52 Schoendorf A, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10-beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:1501-1506.
- 53 Ajikumar PK, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330(6000):70-74.
- 54 Boghigian BA, et al. Analysis of heterologous taxadiene production in K- and B-derived *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93:1651-1661.
- 55 Dejong JM, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93:212-224.
- 56 Bai H. Study on cell suspension culture and extraction and separation of taxol from *Taxus cuspidata* [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2020.
- 57 Li XH. Effects of light culture on efficient taxol induction by *Taxus cuspidata* [D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2020.
- 58 Hao JW, et al. Effect of UV-B on taxol contents in *Taxus cuspidata* under different extraction methods [J]. *Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学)*, 2019, 47(21):266-269.
- 59 Zhao YX, et al. Impact of precursors on taxol production by endophytic fungi isolated in *Taxus chinensis* [J]. *Jiangsu Agri Sci (江苏农业科学)*, 2019, 47(21):234-238.
- 60 Zhao YX, et al. Influence of growth regulators on taxol produced by endophytic fungi in *Taxus chinensis* [J]. *Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学)*, 2019, 47(7):120-123.
- 61 Christen AA, et al. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture: US5019504A [P]. 1991-05-28.
- 62 Zhang JF, et al. Recent advances in tobacco chloroplast genetic engineering [J]. *Tobacco Sci Technol (烟草科技)*, 2017, 50(6):88-98.
- 63 Bock R. Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new application [J]. *Curr Opin Biotech*, 2014, 26:7-13.
- 64 Boynton JE, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles [J]. *Science*, 1988, 240:1534-1538.
- 65 Dunne A, et al. Modifying fatty acid profiles through a new cytokinin-based plastid transformation system [J]. *Plant J*, 2014, 80:1131-1138.
- 66 Fuentes P, et al. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop [J]. *eLife*, 2016, 5:e13664.
- 67 Xing YX, et al. The *Taxus* genome provides insights into paclitaxel biosynthesis [J]. *Nat Plants*, 2021, 7:1026-1036.