

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.10.008
文章编号: 1005-8982 (2023) 10-0040-08

综述

唾液酸糖表位类人源化N-糖基化修饰 治疗性重组蛋白的研究进展*

李威, 付达, 陆龙臻, 包紫鑫, 吴琼, 胡学军, 丁宁

(大连大学医学院, 辽宁 大连 116622)

摘要: 唾液酸化N-糖基化修饰重组蛋白能提高治疗性蛋白的理化性质, 如延长半衰期、增强组织穿透性以及抑制炎症反应等。但迄今为止糖蛋白的N-糖基化修饰效率和唾液酸化效率都很难达到100%, 这导致了唾液酸修饰糖基化重组蛋白的均质化、规模化生产非常困难。因而提高类人源化N-糖基化修饰治疗性重组蛋白的均质性仍是目前糖蛋白药物研发任务之一。该文围绕提高唾液酸糖表位N-糖基化修饰治疗性重组蛋白效率的方法及均质化类人源化唾液酸糖表位治疗性重组蛋白的生产途径展开综述。

关键词: N-糖基化修饰; 唾液酸糖表位; 大肠杆菌; 重组蛋白

中图分类号: R34

文献标识码: A

Advances on the human-like N-glycosylation of sialylated glycoepitopes in therapeutic recombinant proteins*

Li Wei, Fu Da, Lu Long-zhen, Bao Zi-xin, Wu Qiong, Hu Xue-jun, Ding Ning

(Medical College of Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: Sialylation can improve the physicochemical properties of therapeutic recombinant proteins, such as prolonging the half-life, enhancing the penetrating power and inhibiting inflammatory responses. However, the efficiency of N-glycosylation and sialylation hardly reaches 100%, bringing about the difficulty in homogeneous and large-scale production of sialylated recombinant proteins. Therefore, strengthening the homogeneity of human-like N-glycosylated therapeutic recombinant proteins still represents one of the foci of glycoprotein drug development. This review is centered on the approaches to increasing the efficiency of N-glycosylation of therapeutic recombinant proteins and the production process of homogeneous human-like N-glycosylation of sialylated glycoepitopes in therapeutic recombinant proteins.

Keywords: N-glycosylation; sialylated glycoepitopes; Escherichia coli; recombinant proteins

糖蛋白是细胞外基质主要组成部分, 可以作为信号分子调节机体内因子的表达与活性, 主要分为N-糖基化和O-糖基化的糖修饰方式^[1]。其中, N-糖基化是治疗性药物蛋白最广泛的翻译后修饰方式。糖蛋白治疗药物中含有Fc片段的小分子单克隆抗体MAbs和Fc融合蛋白是目前的研究热点, 可对人

体的各种疾病进行靶向治疗, 但普遍存在稳定性较差的问题^[2]。目前报道多种方法可以提高小分子抗体的稳定性, 包括N-糖基化修饰、二硫键修饰等^[3]。其中唾液酸修饰类人源化N-糖基化重组药物蛋白不仅可以提高蛋白的稳定性, 还能延长半衰期^[4]。

目前, 合成唾液酸化类人源化N-糖基化糖蛋白

收稿日期: 2022-02-26

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 32070936), 辽宁省科学技术计划(No: 2019-ZD-0563)

[通信作者] 丁宁, E-mail: dingning@dlu.edu.cn

的方式主要包括在真核细胞中改建唾液酸修饰途径、体外化学酶-无细胞表达系统,以及在原核细胞内建立唾液酸化N-糖基化修饰重组蛋白途径。但是这些途径中蛋白质的N-糖基化效率以及唾液酸化效率很难达到100%,也就是说唾液酸糖链修饰的类人源化N-糖基化重组蛋白的宏观(N-糖基化位点修饰效率)及微观(糖链结构)均质性低,规模化生产仍然存在困难^[5-6]。

1 治疗性N-糖基化重组蛋白

含有Fc片段的小分子MAbs和Fc融合蛋白是糖基化治疗性重组蛋白的重要组成部分。活化的Fc段可引起抗体依赖的、细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)效应,并产生抗体调理(免疫调理)作用,增强吞噬细胞的吞噬功能。有研究表明,抗体重链的N-连接双天线聚糖可以激活Fc γ 受体从而引发ADCC效应^[1]。因此,糖链上的特定糖基对ADCC效应有很大意义。免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)是体液免疫反应的主要促炎介质。但该研究显示,将 α -2,6连接方式的唾液酸添加到IgG重链的N-连接双天线聚糖链末端,会减少IgG与Fc γ 受体的结合,减弱其引起的炎症反应。具体机制可能是唾液酸化激活状态的Fc段通过与凝集素受体(SIGN-R1或DC-SIGN)结合而减少与炎症细胞表面Fc受体(Fc γ R IIb)结合,从而减轻自身抗体引发的炎症^[1-2]。

目前多种重组N-糖基化单克隆抗体(免疫球蛋白)已经应用于临床治疗。自2000年以来,包括MAbs在内的N-糖基化治疗性蛋白药物市场规模呈指数级增长^[7]。仅癌症治疗方面,美国食品和药物管理局就批准了30多种MAbs^[8-10]。但是,其生产成本居高不下。主要原因是由于许多哺乳动物细胞系会产生一些非人源化的N-糖基化结构表位,如galactose- α -1,3-galactose和N-羟乙酰神经氨酸,这些N-糖基化结构可以在人体内引起免疫反应。故目前只有部分产类人源化N-糖基化结构的哺乳动物细胞系可以用于MAbs的生产^[11-12]。因此,寻找适合N-糖基化修饰药物蛋白批量生产的途径已成为亟须解决的问题。

2 均质性N-糖基化治疗性重组蛋白

N-糖基化是最广泛的治疗性蛋白翻译后修饰

方式。然而,不同物种的细胞N-糖基化修饰效率是不同的,呈现出宏观不均一性^[13]。并且由于糖类与蛋白质及核酸的生物合成方式不同,糖链的体内合成是一个非模板驱动的过程,产物呈现为结构相近、具有微观不均一性、不同糖表位的复杂糖链混合物。因此,探讨均质性N-糖基化重组蛋白的不同合成途径对低成本生产治疗性蛋白的影响至关重要。

N-连接的糖基化是指寡糖基转移到天冬酰胺残基上^[14]。N-糖基化蛋白是重要的细胞外基质成分,在组织内稳态和发育过程中起着至关重要的作用。例如:调节细胞因子(趋化因子、生长因子和黏附分子等)的表达和活性,并作为信号辅助受体发挥作用。在细胞表面,蛋白多糖通过这些相互作用在实体瘤和血液系统恶性肿瘤的发展过程中影响着癌细胞的行为和微环境^[15]。但N-糖基化寡糖链末端不同糖表位修饰对治疗性蛋白的半衰期、组织穿透性、炎症反应等方面影响尚缺乏深入研究。例如, α -2,3- α -2,6和 α -2,8等不同连接方式的糖链末端所形成的唾液酸糖表位对重组蛋白功能影响的研究仍是空白^[16-17]。这是由于唾液酸修饰糖表位的效率不高,很难达到100%修饰。因此,提高不同连接方式的唾液酸糖表位末端修饰N-糖链的效率是需要迫切解决的问题。

总之,人体内N-糖基化修饰的寡糖链通常具有高度多样化的结构,且结构清晰、均一的N-糖基化治疗性重组蛋白的生产有助于全面研究其分子和生物学作用机制。更重要的是,开发经济高效的合成系统将对N-聚糖的制备产生革命性的影响,并推动相关药物的应用^[18-19]。

3 唾液酸糖表位N-糖基化修饰治疗性重组蛋白的研究

唾液酸是一类九碳酸性单糖,携带负电荷,具有亲水性,通常位于聚糖链的末端位置^[20]。基于完整的人源糖链研究数据表明,体内存在多种含有唾液酸修饰的糖表位,如 α -2,3连接的Sialyl Lewis a/Sialyl Lewis x抗原、 α -2,6连接的Sialyl Tn抗原及混合的Disialyl T Antigen抗原等(见表1)。目前其功能尚未完全阐述清楚,需进一步制备均一的糖链进行实验以明确寡糖中具有功能的最小含唾液酸糖表位结构。

表 1 唾液酸糖表位

Glycoepitopes ID/参考文献	唾液酸糖表位	序列
BALNEGER 等 ^[21]	Sialyl Lewis a	Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc[Fuc(α 1-3)]
BALNEGER 等 ^[21]	Sialyl Lewis x	Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GlcNAc[Fuc(α 1-4)]
EP0015	Sialyl 6-Sulfo Lewis x	Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)][HSO3(-6)]GlcNAc(β 1-)-R
EP0016	6,6'-Disulfo Sialyl Lewis x	Neu5Ac(α 2-3)[HSO3(-6)]Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)][HSO3(-6)]GlcNAc(β 1-)-R
EP0017	Cyclic Sialyl 6 -Sulfo Lewis x	cyclicNeu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)][HSO3(-6)]GlcNAc-R
EP0019	VIM-2	Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-)-R
EP0022/WANG 等 ^[22]	Sialyl Tn Antigen	Neu5Ac(α 2-6)GalNAc(α 1-)-Ser/Thr
EP0023	Disialyl T Antigen	Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-6)]GalNAc(α 1-)-Ser/Thr

注：<https://glycoforum.gr.jp/article/22A14.html>

3.1 唾液酸糖表位 N-糖基化修饰治疗性重组蛋白

末端不同连接方式唾液酸(主要为 α -2,3、 α -2,6和 α -2,8)修饰的 N-糖链是常见修饰形式之一。唾液酸在生物体内分子和膜的相互作用中起着重要的稳定和调节作用。这是由于唾液酸具有较高的电负性,可促进分子的结合作用,支持药物和离子在细胞内的转运。同时这也加强了细胞抵抗来自糖苷酶和蛋白酶的降解。因此,唾液酸可以一定程度帮助糖蛋白延长其半衰期和生物活性,但受困于研究材料的不足,糖链末端不同连接方式唾液酸所形成的唾液酸糖表位对重组抗体类药物功能影响的研究至今未深入展开。目前已知的各类天然唾液酸转移酶均不能在含有 N-糖基化位点的复杂底物上实现 100% 的唾液酸糖基化修饰,如大肠杆菌体内所构建的基于空肠弯曲杆菌的 N-糖基化修饰系统经优化后末端 α -2,6 唾液酸修饰最高效率是 70% 左右, α -2,3 唾液酸修饰最高效率是 40% 左右, α -2,8 唾液酸修饰最高效率是 20% 左右,需要继续优化代谢合成途径以提高其修饰效率,即均质性^[5-6]。

近期有研究显示,肿瘤转化与 Sialyl Lewis a (sLea)、Sialyl Lewis x (sLex) 及 Sialyl-Tn 抗原表达的特征性变化有关。这几种抗原代表了典型的肿瘤相关糖抗原,普遍存在着唾液酸修饰的糖表位,其中 sLea 是 E-选择素的配体^[21-23],sLex 是 E、P 和 L-选择素这 3 种黏附分子的配体。sLex 在一些恶性上皮性肿瘤的浸润、转移过程中发挥重要作用,所以 sLex 是一种设计肿瘤疫苗的合适靶标。山东大学课题

组^[24]将 sLex 与重组 CRM197 蛋白(白喉毒素突变体)或 KLH 蛋白(玳孔血蓝蛋白)相连接,合成了 CRM197-sLex 和 KLH-sLex 结合物疫苗,体外实验显示,CRM197-sLex 和 KLH-sLex 结合物疫苗可以杀伤针对 sLex 抗原的肿瘤细胞或抑制其迁移。蛋白载体连接的 sLex 衍生物(sLex-方酸乙酯)在小鼠体内表现出良好的抗肿瘤效果。而 Sialyl-Tn 则是一种与黏蛋白相关的双糖抗原,由 MUC2 等糖蛋白携带,在肿瘤生物学中发挥重要作用。其在正常组织中不易检测,在结直肠癌中,Sialyl-Tn 不仅定位于晚期,也定位于早期高尔基体室,尤其是某些粗面内质网腔。大肠腺瘤 Sialyl-Tn 唾液酸化发生在跨高尔基体中,而在结直肠癌中 Sialyl-Tn 可以唾液酸化发生在所有高尔基体和粗面内质网中^[14]。因此,Sialyl Lewis a 和 Sialyl-Tn 成为治疗疾病尤其是癌症的有效靶点,但是尚未见相关药物的临床报道,笔者推测其广泛应用也有赖于药物均质性的提高。

3.2 唾液酸糖表位 N-糖基化治疗性重组蛋白的合成与生产

目前主要应用 3 个平台合成生产不同唾液酸糖表位 N-糖基化修饰的治疗性重组蛋白,但都未实现 100% 唾液酸修饰的均质性生产:①通过在宿主细胞中表达异源酶或抑制现有酶来构建唾液酸化途径。研究表明,通过关键酶的调控表达可以产生较为均一的类人源化糖基化和唾液酸化修饰的重组蛋白^[25-26]。其中,宿主主要包括中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞、昆虫和植物。②通过化学-酶法无细胞表达系统,即在细胞外重建合成类

人源化糖基化和唾液酸化治疗性重组蛋白的糖基化途径,以排除非人源化细胞系统固有的异源酶等物质。这些酶可以通过合理的设计和定向改造使非天然的唾液酸底物进行唾液酸化反应,有助于推进糖化学和唾液酸功能的研究。③在微生物如大肠杆菌细胞内建立唾液酸化N-糖基化修饰治疗性重组蛋白途径。由于利用哺乳动物表达系统生产唾液酸化治疗性重组蛋白质成本非常高,故低廉的表达宿主和能够高效合成类人源化唾液酸化蛋白系统的研究很有意义^[27-28]。笔者就目前不同平台合成类人源化N-糖基化重组蛋白途径进行以下总结。

3.2.1 真核细胞合成生产唾液酸糖表位N-糖基化治疗性重组蛋白 真核生物天然N-糖基化蛋白具有的唾液酸连接方式有 α -2,3、 α -2,6和 α -2,8等。真核细胞合成的聚糖性质较其他合成途径而言与人类更为相似。但是,天然真核细胞表达系统糖表位修饰N-糖基化重组蛋白的均质性很低,并且在生物技术中通常用于生产治疗性糖蛋白的哺乳动物细胞系表达的唾液酸化糖蛋白也不均质。这种异质性源于哺乳动物复合型N-多糖合成的多步骤过程。

SHEPARD等^[29]、LULEY-GOEDL等^[30]、THI等^[31]同时过量表达2个关键的唾液酸化相关酶,即人 β -半乳糖苷 α -2,6唾液酸转移酶I和UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc激酶,在CHO工程细胞中获得了均质性较好的 α -2,6连接的唾液酸修饰的重组蛋白,其产出率比野生型增加了7倍以上,可有效地合成生产唾液酸化类人源化N-糖基化治疗性重组蛋白。

酵母经工程化改造后,产生末端 α -2,6唾液酸化双天线聚糖修饰的人N-糖蛋白,Sia2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc修饰效率约为90.5%,SiaGal2GlcNAc2Man3GlcNAc修饰效率约为7.9%,呈异质性^[25]。为进一步解决糖蛋白均质性低的问题,MEURIS等^[32]开发了HEK 293S衍生细胞中糖缺失途径,该途径可将哺乳动物细胞中的高尔基体N-糖基化途径缩短以产生末端唾液酸化的N-糖蛋白。具体方法为先将编码N-乙酰氨基葡萄糖转移酶I的基因失活,最终表达生产出75%糖链末端含有唾液酸化修饰的蛋白质(Neu5Ac- α -2,3-Gal- β -1,4-GlcNAc)。此外,JAROENTOMECHAI等^[26]经理化性质和生物学活性分析发现,蛋白质经 α -2,3唾液酸修饰能降低初始血清清除率,并且未形成新的免疫原性表位。虽然

该策略提高了真核生物系统表达生产唾液酸修饰N-糖基化重组蛋白的均质性,但该系统培养所需的高成本、长周期仍达不到产业化的生产要求。

总之,真核细胞具有表达类人源化唾液酸修饰治疗性重组蛋白的先天性优势。但是由于其内部结构复杂且遗传背景难以改造,导致了唾液酸化N-糖基化重组蛋白均质化、规模化生产困难。

3.2.2 体内外结合的酶催化技术生产不同唾液酸糖表位N-糖基化治疗性重组蛋白 在众多的合成方法中,体内外结合的化学-酶法作为化学合成的替代方法结合了化学法和酶法的优点,具有较高的立体选择性和经济效益。同时,许多已鉴定或商品化的唾液酸转移酶和大规模的单糖供体制备方法也为化学-酶法合成N-糖链结构提供了强有力的支持。到目前为止,3种结构明确的N-聚糖(即高甘露糖、杂交型和络合型)大多是从化学合成的材料或分离的天然底物出发,通过化学-酶策略产生的。这些N-糖链可用于糖链与糖类相互作用的微阵列分析、均一糖蛋白的制备和潜在糖链生物标志物的组装。此外,自动化的固相化学-酶法合成N-聚糖正在研究中。由于N-聚糖在生物途径中起着重要的作用,探索建立成熟、简便的化学-酶法合成N-多糖结构技术将是当前的前沿研究方向。

研究人员目前主要应用体外酶催化技术和细胞体内基因调控技术来控制糖基化位点和精确优化糖型结构:①体外化学-酶合成法简单高效,有课题组利用cell-free平台,依赖不同工具酶对糖链进行修饰,合成了含有末端 α -2,6唾液酸修饰的均质性IgG抗体及多种糖蛋白^[33]。但此系统中多种酶及底物(神经氨酸等)价格昂贵,唾液酸易降解,成本高;蛋白产物需要二次纯化,工艺复杂,很难实现规模化生产;②体内酶催化技术主要通过基因重组控制各真核细胞体内单糖转移酶的含量来调控糖型,如在CHO细胞、昆虫、酵母、藻类等,但其糖链均质化改造过程困难;宿主基因组背景复杂,多因素影响酶含量、活性,呈现出高度的动态变化,导致糖链批次间差异大^[34]。例如,尽管家蚕杆状病毒表达系统可以生产某些重组糖蛋白,然而与人类相比,家蚕的N-聚糖结构是少甘露糖型的N-聚糖,不含有唾液酸或半乳糖残基。因此,SUGANUMA等^[35]在家蚕体内通过共表达半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶,并提供唾液酸合成相关底物,实现了半乳

糖化和唾液酸化修饰,可获得均质性较高的 α -2,3/ α -2,6连接的唾液酸化N-聚糖。此外,N-乙酰氨基葡萄糖转移酶II与上述两种酶的共表达,促进额外的双唾液酸化N-聚糖结构的形成,使家蚕生产均质性N-糖基化蛋白的研究步入了新阶段。

另一方面由于活细胞代谢途径调控及监测手段的条件限制,目前无法在体内精确控制唾液酸化及糖基化过程所需成分及比例。为克服这一难题,一种新的无活细胞糖蛋白合成(CFGpS)技术得到应用。这项技术可利用唾液酸修饰的糖基化大肠杆菌来获得特异性的富含糖基化成分的细胞提取物,包括寡糖转移酶和脂链寡糖。由此得到的细胞提取物能够将蛋白质的生物合成与天冬酰胺连接的蛋白质糖基化无缝地结合在一起。但不同唾液酸连接方式的糖链合成效率及唾液酸化糖链能否高效、定点地修饰目标蛋白尚需进一步研究。CFGpS

平台高度模块化,允许使用多个不同的寡糖转移酶和结构多样化的脂链寡糖^[36-37]。因此,笔者预计CFGpS将促进对唾液酸糖表位功能的基本理解,并使在按需订制均质化糖蛋白的应用成为可能,但是工艺复杂,生产成本居高不下,需要进行系统的优化。

总之,尽管通过体内基因调控不同寡糖链合成的优化方法较为复杂,但是就治疗性N-糖基化重组蛋白的生产成本和均质性来看,目前体内调控/构建均质化唾液酸合成途径要优于在体外建立化学-酶催化途径的方法。

3.2.3 大肠杆菌体内生产唾液酸化N-糖基化治疗性重组蛋白 大肠杆菌表达系统和其他系统相比具有效率高、成本低的优势。目前人们已经在大肠杆菌中建立了几条可高效生产N-糖基化重组蛋白的途径(见表2)。

表 2 可均质性生产N-糖基化重组蛋白的途径

参考文献	N-糖基化修饰位置	合成途径	优点	缺点
ZHU 等 ^[5]	质周腔	模仿人源化唾液酸末端部分(Neu5Ac- α -2,6-Gal- β -1,4-GlcNAc-)	合成唾液酸化五糖(Neu5Ac- α -2,6-Gal- β -1,4-GlcNAc- β -1,3-Gal- β -1,3GlcNAc-);利用大肠杆菌低成本生产高产量的末端唾液酸修饰的类人源化N-糖基化重组蛋白	需要继续优化提高均质性
JAROENTO - MEECHAI 等 ^[36]	细胞质	基于糖工程平台将聚糖定位到大肠杆菌细胞质中的重组蛋白上	可以产生多种多价糖结构包括带有数百个聚糖表位拷贝的自组装纳米材料	由于核苷酸糖的利用率不足、糖基转移酶的表达不平衡和糖基转移酶对底物活性低的问题,导致其不能完全糖基化修饰
FELDMAN 等 ^[40]	细胞质	基于来源于胸膜肺炎放线菌的N-糖基转移酶的生物合成途径	在 α -2,8-唾液酸转移酶作用下定点多聚唾液酸化修饰	糖蛋白均质性较低;需要外源加入 Neu5Ac
YATES 等 ^[44]	细胞质	优化来源于酵母的糖链合成酶	细胞表面 Man3GlcNAc2 水平增加 4 倍;糖基化受体蛋白产量高出 5 倍	不能适用于其他类人源糖链进行糖基化效率优化

VALDERRAMA-RINCON 等^[38]通过向大肠杆菌体内加入4种真核糖基转移酶,包括酵母尿苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶ALG13和ALG14,以及甘露糖转移酶Alg1和Alg2,能够实现寡糖合成;利用空肠弯曲菌的细菌寡糖转移酶,成功将寡糖转移到蛋白,在大肠杆菌中合成真核细胞核心五糖Man3GlcNAc2修饰的糖蛋白。并且,目前已在进行 α -2,6唾液酸均质性修饰治疗性蛋白的研究。值得注意的是,在此途径中细菌糖工程平台需要将受体蛋白分泌到质周腔,并将寡糖底物与脂联前体进行组装,这限制了靶蛋白和糖底物之间的连接效率。

同期TYTGAT等^[39]研究发现,可将胸膜肺炎放线杆菌的糖基转移酶作为细胞质糖基化平台的基础,实现将单个 β 连接的葡萄糖转移到重组蛋白的N-X-S/T糖基化位点上,提高了细菌或哺乳动物来源的特定糖链连接到重组蛋白上的效率。这个基于细菌胞质内糖工程平台可以用来生产多种均质的聚糖结构,甚至带有数百个糖基表位的自组装纳米材料,预计将在生物医学等多领域得到广泛应用。

然而,最常用于表达蛋白的工程化大肠杆菌缺乏类似哺乳动物的糖基化途径,大肠杆菌生产糖基化和唾液酸化蛋白质需要引入外源糖基化途径^[40]。

这导致许多真核生物来源酶不能发挥正常功能,工程大肠杆菌不能完全复制哺乳动物细胞中糖基化反应,即不产生预期糖型。由此可以看出,目前在大肠杆菌体内高效生产完全均质的唾液酸糖表位修饰的糖蛋白仍然是一个难题^[41]。因此,KIERMAIER等^[42]和van LANDUYT等^[43]利用多种微生物来源的糖基转移酶等,设计人体可接受的类人源化糖链是一个有前途的可替代方向。近期,本课题组ZHU等^[5]将流感嗜血杆菌的糖基化转移酶IsgCDEF和空肠弯曲杆菌的NeuBCA酶引入大肠杆菌中,使其产生唾液酸化聚糖前体CMP-Neu5Ac。然后在质周腔中通过寡糖转移酶转移到目标蛋白上,并通过 α -2,6连接的唾液酸转移酶,使大肠杆菌能够生产出均质性较高的唾液酸化N-糖基化蛋白。

因此,未来以大肠杆菌为主的原核生物作为糖工程生产宿主将在生物制药生产中日益重要。这是由于微生物细胞与哺乳动物细胞相比,生产成本低、遗传背景简单,更易于工程化改造为糖蛋白质高效表达的宿主。

3.2.4 唾液酸糖表位修饰N-糖基化治疗性重组蛋白的检测 目前,主要应用基质辅助激光解吸/电离(mass-assisted laser desorption/ionization, MALDI)质谱分析糖基化蛋白分子量变化、分析生物药物(如IgG)的清除。其困难是低丰度和不稳定区域的唾液酸和磷酸基团的解离。近期研究表明,一种用于糖肽类、碳水化合物和磷酸肽类检测的新的液体基质3-氨基喹啉/对香豆酸(3-AQ/CA)与3-AQ/CHCA或2,5-dhb相比,更能有效抑制不稳定区如唾液酸或磷酸基团的离解和中性碳水化合物的断裂^[45]。并且,de HAAN等^[46]通过高度重复的唾液酸衍生化机制利用MALDI-TOF MS分析可以获得糖基化多肽碎片的光谱信息,从而检测唾液酸。这些方法在未来治疗性抗体的位点和唾液酸连接特异性糖基化分析,以及从血浆中提取的临床IgG样本中发现特异性生物标志物方面具有相当大的潜力。

此外,还可应用流式细胞分析仪来检测、评估、改进大肠杆菌中N-糖基化蛋白的生物合成。目前,研究人员利用流式细胞分析仪发现降低合成途径相关酶的表达水平和过表达核苷酸糖生物合成基因,可将脂质连接的Man3GlcNAc2的产量提高近50倍;在Man3GlcNAc2底物增加的细胞中获得的糖基

化蛋白是未优化细胞的14倍,但唾液酸修饰具体情况目前尚未见报道。

4 讨论

糖工程的一个有希望的趋势是将糖链的复杂性降到最低,目的是获得最有用但又尽可能小的糖表位结构:在生产宿主体内建立糖基化途径的集成工程,应用上下游的体外酶改造多糖、并应用唾液酸水解酶等进行重塑,以去除不需要的糖链结构。另一方面,由于需要多种活化的供体底物,使应用唾液酸糖基转移酶(添加所需的糖结构)进行重塑更为复杂。到目前为止,与直接含有部分多糖的细胞(糖工程细胞或野生型细胞)生产的蛋白质相比,所涉及的成本还没有得到收益的保证。因此,目前基于均质的唾液酸糖蛋白进行不同糖表位功能的研究仍然是一个巨大的挑战。

唾液酸修饰是改善药物蛋白理化性质、改善药代动力学特性的重要方法之一。重要的是,不同唾液酸糖表位修饰的糖链还能高效地赋予重组蛋白多重生物功能。体内研究还发现唾液酸修饰能调控补体系统、降低免疫原性等,在炎症及肿瘤的发生、发展过程起重要作用^[47]。但上述研究是基于完整的人源糖链,尚需进一步明确寡糖中发挥功能的最小唾液酸结构,即糖表位。

大肠杆菌是生产治疗性药物蛋白的常见宿主,通过美国食品药品监督管理局认证的药物蛋白大约30%通过大肠杆菌生产。与哺乳动物细胞表达系统相比,大肠杆菌表达系统具有基因组背景清楚、工程菌株构建简单快速、生产周期短、发酵成本低廉、产量高和适合大规模工业化生产等优点。预计通过进一步糖工程改造可将多种原核生物来源的寡糖转移酶(可识别并将寡糖转移到重组蛋白的糖基化识别序列)和糖基转移酶(非模板驱动性合成寡糖链)在大肠杆菌中共表达后,完成均质性寡糖合成及高效、定点的N-糖基化修饰重组蛋白全过程,可实现规模化生产所需的均质性及低成本生产。这是真核生物N-糖基化修饰系统不可比拟的优势。

5 结论

综上所述,唾液酸修饰重组治疗性糖蛋白的生

产宿主主要为 CHO 细胞、植物、昆虫等真核生物以及大肠杆菌等原核生物。研究显示改造后大肠杆菌工程菌株具备了特有的优势:将原核生物来源的 N-糖基化重组蛋白机制引入大肠杆菌中,可以实现定点、均质性 N-糖基化修饰重组蛋白的生产,且更容易规模化生产。随着糖基化工程生物制药企业在 2012 年上市,糖基化治疗性药物研究现在已经成为生物制药行业的热点,进行唾液酸化 N-糖基化修饰重组蛋白高效、均质化生产研究具有良好的应用前景。

参 考 文 献 :

- [1] ANTHONY R M, RAVETCH J V. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30 Suppl 1: S9-S14.
- [2] KANEKO Y, NIMMERJAHN F, RAVETCH J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation[J]. *Science*, 2006, 313(5787): 670-673.
- [3] ZENG F, YANG C P, GAO X Y, et al. Comprehensive elucidation of the structural and functional roles of engineered disulfide bonds in antibody Fc fragment[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(49): 19127-19135.
- [4] RANA R, RANI S, KUMAR V, et al. Sialic acid conjugated chitosan nanoparticles: modulation to target tumour cells and therapeutic opportunities[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 23(1): 10.
- [5] ZHU J, RUAN Y, FU X, et al. An engineered pathway for production of terminally sialylated N-glycoproteins in the periplasm of *Escherichia coli*[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 313.
- [6] DING N, RUAN Y, FU X, et al. Improving production of N-glycosylated recombinant proteins by leaky *Escherichia coli*[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(8): 302.
- [7] MCINNES I B, GRAVALLESE E M. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(10): 680-686.
- [8] COUSSENS N P, BRAISTED J C, PERYEA T, et al. Small-molecule screens: a gateway to cancer therapeutic agents with case studies of food and drug administration-approved drugs[J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(4): 479-496.
- [9] MACARRON R, BANKS M N, BOJANIC D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(3): 188-195.
- [10] COSTA A F, CAMPOS D, REIS C A, et al. Targeting glycosylation: a new road for cancer drug discovery[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(9): 757-766.
- [11] ZHANG Y R, FAN C, ZHANG L J, et al. Glycosylation-dependent antitumor therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 163: 471-485.
- [12] HEVEY R. Strategies for the development of glycomimetic drug candidates[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12(2): 55.
- [13] PIRON R, SANTENS F, DE PAEPE A, et al. Using GlycoDelete to produce proteins lacking plant-specific N-glycan modification in seeds[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11): 1135-1137.
- [14] XIN M M, YOU S S, XU Y T, et al. Precision glycoproteomics reveals distinctive N-glycosylation in human spermatozoa[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(4): 100214.
- [15] ESPINOZA-SÁNCHEZ N A, GÖTTE M. Role of cell surface proteoglycans in cancer immunotherapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 62: 48-67.
- [16] MIMURA Y, KATOH T, SALDOVA R, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy[J]. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 47-62.
- [17] DALZIEL M, CRISPIN M, SCANLAN C N, et al. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 1235681.
- [18] CHAO Q, DING Y, CHEN Z H, et al. Recent progress in chemo-enzymatic methods for the synthesis of N-glycans[J]. *Front Chem*, 2020, 8: 513.
- [19] DING N, FU X, RUAN Y, et al. Extracellular production of recombinant N-glycosylated anti-VEGFR2 monobody in leaky *Escherichia coli* strain[J]. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(11): 1265-1274.
- [20] UNIONE L, MOURE M J, LENZA M P, et al. The SARS-CoV-2 spike glycoprotein directly binds exogenous sialic acids: a NMR view[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(18): e202201432.
- [21] BALNEGER N, CORNELISSEN L A M, WASSINK M, et al. Sialic acid blockade in dendritic cells enhances CD8⁺ T cell responses by facilitating high-avidity interactions[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 98.
- [22] WANG F, GOTO M, KIM Y S, et al. Altered GalNAc-alpha-2,6-sialylation compartments for mucin-associated sialyl-Tn antigen in colorectal adenoma and adenocarcinoma[J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(12): 1581-1592.
- [23] FERNANDES E, FREITAS R, FERREIRA D, et al. Nucleolin-Sle A glycoforms as E-selectin ligands and potentially targetable biomarkers at the cell surface of gastric cancer cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 861.
- [24] 金凡琪. 包含 sLex 的肿瘤糖疫苗的可行性评价与 sLex 衍生物 (sLex-方酸乙酯) 的活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [25] HAMILTON S R, DAVIDSON R C, SETHURAMAN N, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins[J]. *Science*, 2006, 313(5792): 1441-1443.
- [26] JAROENTOMECHAI T, TAW M N, LI M J, et al. Cell-free synthetic glycobiology: designing and engineering glycomolecules outside of living cells[J]. *Front Chem*, 2020, 8: 645.

- [27] WANG Q, YIN B J, CHUNG C Y, et al. Glycoengineering of CHO cells to improve product quality[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1603: 25-44.
- [28] ŠTAMBUK T, KLASIĆ M, ZOLDOŠ V, et al. N-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 79: 100891.
- [29] SHEPARD H M, PHILLIPS G L, D THANOS C, et al. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins[J]. *Clin Med (Lond)*, 2017, 17(3): 220-232.
- [30] LULEY-GOEDL C, CZABANY T, LONGUS K, et al. Combining expression and process engineering for high-quality production of human sialyltransferase in *Pichia pastoris*[J]. *J Biotechnol*, 2016, 235: 54-60.
- [31] THI SAM N, MISAKI R, OHASHI T, et al. Enhancement of glycosylation by stable co-expression of two sialylation-related enzymes on Chinese hamster ovary cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126(1): 102-110.
- [32] MEURIS L, SANTENS F, ELSON G, et al. GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 485-489.
- [33] KIGHTLINGER W, DUNCKER K E, RAMESH A, et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5404.
- [34] DICKER M, STRASSER R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(10): 1501-1516.
- [35] SUGANUMA M, NOMURA T, HIGA Y, et al. N-glycan sialylation in a silkworm-baculovirus expression system[J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126(1): 9-14.
- [36] JAROENTOMECHAI T, STARK J C, NATARAJAN A, et al. Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2686.
- [37] DING N, YANG C G, SUN S X, et al. Increased glycosylation efficiency of recombinant proteins in *Escherichia coli* by auto-induction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 138-143.
- [38] VALDERRAMA-RINCON J D, FISHER A C, MERRITT J H, et al. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*[J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(5): 434-436.
- [39] TYTGAT H L P, LIN C W, LEVASSEUR M D, et al. Cytoplasmic glycoengineering enables biosynthesis of nanoscale glycoprotein assemblies[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5403.
- [40] FELDMAN M F, WACKER M, HERNANDEZ M, et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(8): 3016-3021.
- [41] KEYS T G, WETTER M, HANG I, et al. A biosynthetic route for polysialylating proteins in *Escherichia coli*[J]. *Metab Eng*, 2017, 44: 293-301.
- [42] KIERMAIER E, MOUSSION C, VELDKAMP C T, et al. Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition[J]. *Science*, 2016, 351(6269): 186-190.
- [43] VAN LANDUYT L, LONIGRO C, MEURIS L, et al. Customized protein glycosylation to improve biopharmaceutical function and targeting[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 60: 17-28.
- [44] YATES L E, NATARAJAN A, LI M J, et al. Glyco-recoded *Escherichia coli*: recombineering-based genome editing of native polysaccharide biosynthesis gene clusters[J]. *Metab Eng*, 2019, 53: 59-68.
- [45] FUKUYAMA Y, FUNAKOSHI N, TAKEYAMA K, et al. 3-Aminoquinoline/p-coumaric acid as a MALDI matrix for glycopeptides, carbohydrates, and phosphopeptides[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(4): 1937-1942.
- [46] DE HAAN N, REIDING K R, HABERGER M, et al. Linkage-specific sialic acid derivatization for MALDI-TOF-MS profiling of IgG glycopeptides[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8284-8291.
- [47] HU X J, HORTIGÜELA M J, ROBIN S, et al. Covalent and oriented immobilization of scFv antibody fragments via an engineered glycan moiety[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(1): 153-159.

(李科 编辑)

本文引用格式: 李威, 付达, 陆龙臻, 等. 唾液酸糖表位类人源化 N-糖基化修饰治疗性重组蛋白的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(10): 40-47.

Cite this article as: LI W, FU D, LU L Z, et al. Advances on the human-like N-glycosylation of sialylated glycoepitopes in therapeutic recombinant proteins[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(10): 40-47.