

· 双清论坛:重大疾病疫苗研究的关键科学问题 ·

## 生物法制备细菌多糖结合疫苗的研究进展

潘超 朱力 王恒樑\*

军事科学院军事医学研究院 生物工程研究所,北京 100071

**[摘要]** 多糖结合疫苗被认为是目前最为成功的细菌性疫苗形式之一,在人类传染病防控方面发挥了巨大作用。然而,目前多糖结合疫苗的制备所采用的化学偶联方法生产成本高、产品均一性低、环保压力大,制约着这种疫苗的进一步发展。近年来逐渐兴起的生物法制备策略主要利用细菌中蛋白糖基化系统,采用全生物合成的方法只需一步即可高效制备多糖结合疫苗,很好地解决了化学法的不足,并且使新一代疫苗具备了更大的定向设计空间和发展潜力。本文梳理了生物法制备多糖结合疫苗的研究成果及最新进展,明确了生物制备方法中的关键环节,并对多糖结合疫苗的进一步优化提出了建议。

**[关键词]** 多糖结合疫苗;生物合成;蛋白糖基化;病原细菌

疫苗在维护人类健康方面发挥着重要作用。在人类历史上,通过广泛的疫苗接种,一些严重威胁人类健康的烈性传染病(如天花、白喉、破伤风等)已经成功地被控制或消灭。然而,目前世界上依然有许多传统的或新发的传染病在全球或局部爆发,如正在全球肆虐的新冠肺炎、贫穷或战乱地区常常爆发的霍乱疫情、畜牧地区常常发生的布氏杆菌感染等。虽然大多数细菌性传染病通过抗生素的使用能够很快缓解,但是相对于疫苗接种而言,其所要花费的医疗成本要大得多,并且近年来越来越多的多重耐药“超级细菌”不断出现,为临床医疗实践带来了极大的困扰,比如一些多重耐药的鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌等已达到无抗生素可用的地步。此外,对于一些在细胞内部繁殖的细菌如布氏杆菌,利用抗生素很难治愈。因此,针对这些威胁人类健康的病原细菌进行疫苗的研发具有重要意义。

细菌性疫苗主要包括灭活疫苗、减毒活疫苗、蛋白类疫苗、多糖类疫苗以及多糖结合疫苗等形式。其中,全球市场上最为瞩目的无疑是多糖结合疫苗。多糖结合疫苗是将细菌表面多糖与载体蛋白进行偶联制备而成。细菌表面多糖主要包括 O-抗原多糖(O-Antigen Polysaccharide, OPS)和荚膜多糖(Capsular



王恒樑 博士,军事科学院军事医学研究院生物工程研究所副所长、病原微生物生物安全国家重点实验室副主任、博士生导师。国家杰出青年科学基金、中国科协求是杰出青年实用工程奖、首届科技部和盖茨基金联合颁发青年科学家奖获得者,入选国家百千万人才工程(获国家有突出贡献中青年专家称号)。主要从事病原细菌致病机理及基因工程疫苗研究。



潘超 博士,军事科学院军事医学研究院生物工程研究所助理研究员。

Polysaccharide, CPS),都具有很强的种属特异性,且已被证明是有效的候选疫苗。但单独的多糖为 T 细胞非依赖(T Cell-Independent, TI)抗原,免疫后直接与 B 细胞表面的 B 细胞受体相互作用,刺激 B 细胞活化并产生具有较低亲和力的以 IgM 为主的抗体,不能激发长久的免疫保护,没有免疫记忆的产生<sup>[1]</sup>。因此,采用多糖作为疫苗时,重复的免疫次数并不能有效强化抗体表达能力,一般需要通过定期

收稿日期:2020-04-29;修回日期:2020-08-07

\* 通信作者,Email:wanghl@bmi.ac.cn

本文受到国家自然科学基金重点项目(81930122)和面上项目(81871314)的资助。

的多次免疫来维持体内抗体水平。此外,由于 2 岁以下婴幼儿 B 细胞尚未发育成熟,因此多糖疫苗对于这类人群无效;而 2 岁以下婴幼儿正是大多数传染病的高危人群,所以这也是多糖疫苗应用的最大局限。

20 世纪 80 年代初,受到半抗原—载体蛋白共轭策略的启发,人们将细菌表面 CPS 与具有 T 细胞表位的蛋白偶联,能够使 T 细胞参与到免疫应答中,从而产生高亲和力的多糖特异性 IgG 抗体及免疫记忆,而且这种疫苗对老人和儿童均有效。在之后的三十多年里,一系列多糖结合疫苗通过化学交联的方法被成功研制并应用于临床,在预防由流感嗜血杆菌、肺炎链球菌和脑膜炎奈瑟菌等高致病性病原体引起的传染病方面发挥着重大作用。其中,由辉瑞公司研制的 13 价肺炎多糖结合疫苗(PCV13),常年居于全球疫苗销售第一,2017 年市场销售额达到 56.9 亿美元,占全球疫苗市场份额的 20%。随着科技的不断发展,一种更为高效的蛋白—多糖结合方法——生物偶联技术逐渐兴起,该技术在多糖结合疫苗的制备及升级改造优化方面具有一定的优势。本文重点对多糖结合疫苗的免疫机制以及新型生物制备技术的研究进展进行综述。

## 1 多糖结合疫苗免疫机制

对于多糖结合疫苗的免疫机制已有几十年的研究,其主要的免疫过程基本明确。简单来说,当多糖结合疫苗进入机体后,疫苗在免疫部位被抗原提呈细胞(Antigen Presenting Cell, APC)(主要为树突状细胞,即 DC 细胞)摄取并进入内体中,随后蛋白部分被内体中的蛋白酶消化、释放出多肽表位,并与第二类主要组织相容性复合体(Class II Major Histocompatibility Complex, MHC-II)结合,之后再被提呈到细胞表面。在细胞表面, MHC-II 与抗原形成的复合物与 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面的  $\alpha\beta$  受体结合,并通过表达共刺激分子激活 T 细胞,进而使其分化为辅助性 T 细胞(T Helper Cell, Th),辅助 B 细胞活化。与此同时,糖蛋白还能与 B 细胞表面的受体特异性结合,并在 B 细胞内被加工提呈至 Th 细胞。Th 细胞可表达共刺激分子,并释放细胞因子(如白细胞介素 4 和白细胞介素 2),刺激 B 细胞成熟,从而诱导免疫球蛋白从 IgM 转变为 IgG<sup>[1]</sup>。同时通过 Ig 基因高频突变,产生不同亲和力的抗体,通过与滤泡树突状细胞(Follicular Dendritic Cell, FDC)上的多糖抗原进行反复选择,从而筛选出高亲和力多

糖抗体,并最终产生记忆 B 细胞和浆细胞<sup>[2]</sup>。由于多糖结合疫苗能够同时激发 T 细胞和 B 细胞介导的免疫应答,因此也被认为是目前最成功的细菌性疫苗形式之一。

尽管已经在细胞水平上对这一机制进行了验证,但在这一过程中,多糖部分如何参与免疫应答尚未完全阐明。目前主要有两种观点:

一种观点认为多糖能够被提呈到抗原提呈细胞表面,通过与 T 细胞受体的相互作用,刺激下游特异性免疫应答。在抗原提呈过程中,多糖部分及其偶联的蛋白能够被酶切为分子量小于 10 kDa 的糖肽。由于 MHC-II 只识别蛋白类分子,因此在这一糖肽结构中,多糖能够通过多肽被 MHC-II 运输到细胞表面,之后通过细胞表面的多糖部分激活碳水化合物特异性 T 细胞(Carbohydrate Specific T Cell, Tcarb),从而调节对多糖的适应性免疫应答<sup>[3]</sup>。这一机制已在 3 型肺炎链球菌多糖、3 型 B 群链球菌多糖、沙门氏菌 Vi 多糖、Ib 型 B 群链球菌多糖以及 b 型流感嗜血杆菌多糖的结合疫苗中得到了证实。同时,这一机制也能够解释为什么没有共价结合的蛋白和糖不能诱导最佳的免疫应答。根据这一理论,多糖的抗体产生能力与其偶联位点的多肽具有很大的关系,因此提呈能力强的肽段能够提高多糖特异性抗体的水平。

另一种观点认为,高亲和力多糖特异性抗体的产生,主要是由于糖蛋白中多肽表位刺激 B 细胞成熟,而与所在部位关系不大。如前文所述, B 细胞能够通过特异性的受体摄取多糖蛋白结合物,通过对抗原的加工,载体蛋白中的许多表位都能够被提呈至 Th 细胞,而多糖部分并没有直接与 T 细胞作用。在这一观点中,最核心的是 T-B 细胞的交互作用,这种作用主要在生发中心完成,能够刺激 B 细胞充分活化<sup>[4]</sup>。根据这一理论,载体蛋白对免疫细胞的刺激能力决定了最终的应答强弱,而目前研究也发现,具有较强免疫刺激能力的毒素蛋白如白喉毒素无毒突变体 CRM197、重组铜绿假单胞菌外毒素 A (Recombinant Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A, rEPA)、破伤风类毒素(Tetanus Toxoid, TT)等作为载体能够产生很好的保护效果,已上市的多糖结合疫苗也多以毒素蛋白为载体。

## 2 细菌多糖结合疫苗的制备

生物法制备细菌多糖结合疫苗是相对于传统的化学法而言的。首先简单介绍化学法:即直接通过

化学交联将细菌多糖和蛋白进行偶联,目前市场上多糖结合疫苗均为化学法制备,具体制备过程如图1A所示,首先需要培养病原细菌并对其胞外多糖进行提取与纯化,同时对载体蛋白进行表达与纯化;之后利用化学试剂对多糖和蛋白分别活化,并进行体外交联;最后对交联产物再次纯化,最终得到疫苗产品<sup>[1]</sup>。尽管这一方法已经非常成熟,但仍有许多不足:从制备过程来说,由于涉及到多步纯化,因此产率较低,导致生产成本低,疫苗价格昂贵,很难在发展中国家及贫穷国家普及;从疫苗产品质控来说,由于化学活化位点随机(也可能破坏抗原表位),多糖与蛋白的之间的连接位点以及每个蛋白上连接多糖数量并不明确,最终疫苗产品均一性差,质控困难,通常只能评价整体的多糖与蛋白含量;另外从安全角度讲,由于多糖的制备涉及到致病菌的大规模培养、化学交联涉及到有害化学试剂的处理,对生物安全和环保提出更高的要求,无形中又提高了生产成本。因此,虽然多糖结合疫苗已经取得了巨大的成就,但这种由技术本身带来的不足很难实现突破性的解决。从目前形势来看,疫苗快速及高效制备在传染病疫情的应急防控方面非常重要,因此急需一种全新的制备

方法以打破多糖结合疫苗的制备瓶颈。

过去相当长时间内一直认为细菌中不存在蛋白糖基化修饰,但近年来,随着糖蛋白的发现和深入研究以及合成生物学的不断发展,一种新型的生物法制备细菌多糖结合疫苗技术逐渐兴起。在细菌中,多糖或寡糖通常通过天冬酰胺或丝氨酸/苏氨酸残基上的氨基或羟基与蛋白质共价结合,分别称为N-糖基化和O-糖基化。这种蛋白糖基化主要是在糖基转移酶的催化下完成。研究发现,该糖基化过程与细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)的合成具有很大的相似性:在LPS合成中,OPS在O-抗原连接酶的催化下转移到脂质A核心,形成LPS。其中O-抗原连接酶与糖基转移酶类似,都定位于细菌内膜,且都能够识别连接在脂载体——十一异戊二烯焦磷酸(Undecylisoprene Pyrophosphate, UndPP)上的多糖,且催化反应的场所都是在细菌周间质。不同的是,这两种酶催化反应中,接纳糖链的底物不同:LPS合成中的底物是脂质A核心,而蛋白糖基化中的底物是蛋白质<sup>[5]</sup>。

利用上述原理可以直接在细菌中生物法制备多糖结合疫苗。目前较为流行的生物法制备主要包括

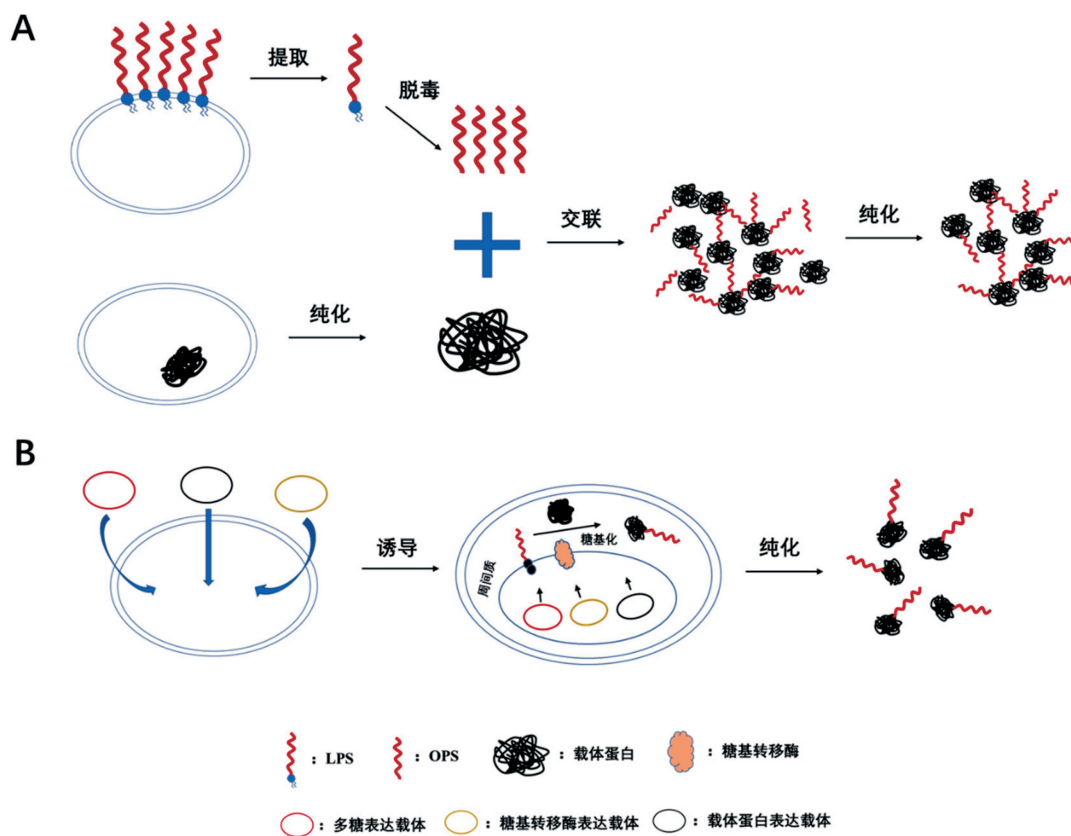


图1 化学法和生物法制备多糖结合疫苗的流程对比

以下几步<sup>[6]</sup>:首先,构建工程菌株,即缺失了 O-抗原连接酶和自身多糖合成基因的大肠杆菌,由于 O-抗原连接酶的缺失阻断了 LPS 的合成,细菌中可产生游离的 OPS;其次,构建含有目标多糖合成基因簇、载体蛋白、糖基转移酶的表达载体,并转入上述工程菌株中,其中载体蛋白需要融合一段糖基转移酶识别的特定序列,即糖基化基序(Glycosylation Motif);最后,经过诱导表达,异源目标多糖在糖基转移酶的催化下,转移到载体蛋白上,并最终经过纯化得到糖蛋白(图 1B)。在上述制备方法中,第一步与第二步为糖蛋白表达系统的构建,而疫苗的生产制备主要通过工程菌株的诱导表达以及一步纯化即可完成,多糖与蛋白的偶联由细菌自身完成。因此,生物法和化学法相比,生产过程大大简化,生产周期缩短,成本降低;多糖通过生物催化偶联在固定的糖基化位点,因此连接方式明确,糖与蛋白的比例确定;工程菌株的培养大大降低了生物安全风险;此外,这种利用生物工程方法制备的多糖结合疫苗,在载体蛋白设计、多糖链长控制、糖蛋白摩尔比等一系列方面都具有更为开放的改造空间,更适合后续优化设计。

### 3 生物法制备多糖结合疫苗的几个关键环节

生物法制备多糖结合疫苗技术刚刚起步,其中涉及到多个值得关注的关键环节,包括糖基转移酶的适用范围、载体蛋白的选择与优化以及多糖的表达,而这些环节都尚未达到最成熟状态,具有非常大的发展空间。

#### 3.1 糖基转移酶

糖基转移酶是实现生物法制备多糖结合疫苗最为关键的要素。尽管目前已发现多种细菌糖基转移酶,但要应用于结合疫苗的制备需满足以下几个条件:首先,糖基转移酶能够在其他细菌中实现功能性表达;其次,糖基转移酶应具有宽松的底物特异性,以识别不同的外源细菌多糖;最后,糖基转移酶具有明确的糖基化修饰识别基序。

来自空肠弯曲杆菌中的糖基转移酶 PglB 是最早被发现并用于多糖结合疫苗研制的糖基转移酶,能够催化 N-糖基化反应。2002 年 Wacker 等首次证明空肠弯曲杆菌 *pgl* 基因簇能够在大肠杆菌中表达,催化其天然底物蛋白 AcrA 发生糖基化,并且其中的 PglB 单独存在即可发挥功能<sup>[7, 8]</sup>。这一开拓性的发现使生物法制备多糖结合疫苗成为了可能。

之后研究发现,与真核生物中 N-糖基化修饰位点序列类似(N-X-S/T 的三肽结构),PglB 的 N-糖基化修饰位点序列为 D/E-X1-N-X2-S/T 的五肽结构,其中 N 为糖基化位点,X1 和 X2 可以是除了脯氨酸之外的任意氨基酸<sup>[9]</sup>。此外,研究表明 PglB 具有宽松的底物特异性,可识别还原端单糖的第 2 位 C 原子有乙酰化修饰的糖链,但前两个糖的连接不能是  $\beta$ 1-4 连接的多糖结构<sup>[10, 11]</sup>。已报道多种细菌的表面多糖满足这一条件,因此可以利用 PglB 制备针对这些细菌的多糖结合疫苗。另外一些特殊的多糖结构,如类鼻疽伯克霍尔德菌 K96243 株的 O-抗原还原末端糖为塔罗糖,同样能够被 PglB 识别,并转移到载体蛋白 AcrA<sup>[12]</sup>。此外,通过对 PglB 定向改造可以进一步扩大其识别的范围。2015 年, Ihssen 等人通过对 PglB 的某些氨基酸进行点突变(S80R、Q287P 和 N311V),能够将伤寒沙门氏菌 LT2(还原端糖是半乳糖)的 OPS 转移到载体蛋白上<sup>[13]</sup>。在实际应用方面,瑞士疫苗制造企业 GlycoVaxyn AG 公司利用这一技术,生产了以 rEPA 为载体蛋白的痢疾志贺氏菌多糖结合疫苗,目前已完成 I 期临床试验,这也是第一个由生物法合成的多糖结合候选疫苗<sup>[14]</sup>。该公司在 2015 年以 1.9 亿美元被国际疫苗巨头 GSK 公司收购。

另一种来自脑膜炎奈瑟菌的糖基转移酶 PglL 也已经被成功应用于疫苗的研发。2007 年, Faridmoayer 等成功实现了 PglL 在大肠杆菌中的功能性表达,证明了单独的 PglL 即可发挥催化活性<sup>[15]</sup>。PglL 催化 O-糖基化反应,糖基化位点为丝氨酸;不同于 PglB 对底物的部分限制,PglL 具有更加宽松的底物特异性,还原末端的多种糖(包括 2, 4-二乙酰氨基-2, 4, 6-三脱氧己糖(DATDH)、N-乙酰半乳糖、N-乙酰葡萄糖、N-乙酰岩藻糖以及半乳糖等)均能够被识别;且前两个糖的连接方式可为  $\alpha$ 1-3、 $\beta$ 1-3、 $\beta$ 1-4 以及  $\alpha$ 1-6,预示着 PglL 在多糖结合疫苗研究方面较 PglB 具有更广泛的应用前景<sup>[16]</sup>。此外,不同于 PglB 底物蛋白的单一化,PglL 的蛋白底物呈现多样化(包括脑膜炎奈瑟菌中 7 种以及淋病奈瑟球菌中的至少 19 种蛋白)<sup>[17, 18]</sup>,但这些底物蛋白的糖基化位点区域并不具保守性。这种糖基化识别基序的不明确性对 PglL 走向应用既是机遇也是挑战。2016 年,我们通过对 PglL 天然糖基化修饰位点氨基酸的一系列点突变及分析优化,首次提出 PglL 的 O-糖基化修饰基序(命名为 MOOR 基序)。这一基序主要由 8 个氨基酸组成(WPXmSXnP),其中

S为糖基化位点,  $X_m$ 为2~3个非脯氨酸的任意氨基酸、 $X_n$ 为1~2个非脯氨酸的任意氨基酸。这一短肽基序的阐明,为疫苗的制备及进一步人工设计优化奠定了基础<sup>[19]</sup>,获得了国际同行的重点关注<sup>[20]</sup>。目前,我们利用PglL的O-糖基化系统已成功制备了志贺氏菌、伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、布氏杆菌等多糖结合疫苗(见表1)。

上述PglB和PglL两种糖基转移酶识别的多糖结构已经覆盖了大多数病原细菌OPS结构,但均不能催化还原端为葡萄糖的聚糖结构。考虑到约75%的肺炎链球菌荚膜多糖的还原端为葡萄糖,制备肺炎链球菌多糖结合疫苗就需要对这两种酶进行升级改造,或挖掘新的糖基转移酶。最近已有科学家证明,从不动杆菌属中新发现的O-连接糖基转移酶PglS可以转移肺炎链球菌还原端为葡萄糖的荚膜多糖,制备的结合疫苗表现出很好的免疫效果<sup>[21]</sup>。这一发现为利用生物法生产多价肺炎多糖结合疫苗奠定了基础,同时进一步扩大了生物法制备多糖结合疫苗的应用范围。在前期总结的基础上<sup>[6]</sup>,我们进一步对生物法制备多糖结合疫苗产品的进展进行完善,目前已有多种候选疫苗正在进行研发及临床试验(表1)。

### 3.2 载体蛋白的选择

多糖与蛋白相连能够将TI抗原转变为T细胞依赖(T Cell-Dependent, TD)抗原,其中载体蛋白对

免疫细胞的激活以及最终的免疫效果有着重要影响。因此,研究者往往选用含有多个抗原表位的毒素类蛋白作为载体,如已上市的7价和13价肺炎多糖结合疫苗(Prevnar<sup>®</sup>和PCV13)以CRM197为载体蛋白,Hib多糖结合疫苗(Hiberix<sup>®</sup>)以TT为载体蛋白,四价脑膜炎奈瑟球菌多糖结合疫苗(Menactra<sup>®</sup>)以白喉类毒素(Diphtheria Toxin, DT)为载体蛋白,近年来刚完成III期临床试验的伤寒多糖结合疫苗(TCV)以rEPA为载体蛋白。同样,在生物法制备的多糖结合疫苗中,也多选择毒素蛋白为载体,如目前已完成I期临床的痢疾志贺氏菌多糖结合疫苗是以rEPA为载体蛋白。但化学法与生物法在载体蛋白的应用上略有不同,化学法对载体蛋白的结构要求较低,只需活化即可;而生物法需考虑不同的载体蛋白结构与糖基化位点序列之间的空间位阻,这可能会影响糖基化反应和最终的糖基化效率。为解决这一问题,大多数糖基化基序均融合在载体蛋白N-端或者C-端,以减少载体蛋白结构对糖基化效率的影响。此外,研究发现通过对糖基化修饰位点序列个别氨基酸的突变,能够提高糖基化效率,这也为糖基化效率优化提供了另一个方向<sup>[19]</sup>。

外源蛋白载体的使用,必将会导致机体产生对蛋白本身的免疫应答。当再次免疫以这种蛋白制备的其他种类疫苗时,体内预存的蛋白抗体有可能会

表1 利用生物法制备的多糖结合疫苗产品

病原菌	多糖类型	载体蛋白*	糖基转移酶	研发状态	参考文献
肺炎链球菌	荚膜多糖(多价)	rEPA	未知	I期临床	[22]
肺炎链球菌	荚膜多糖(4型)	PiuA	PglB	实验室阶段	[23]
肺炎链球菌	荚膜多糖(8,9V和14型/8型)	ComP/rEPA	PglS	实验室阶段	[21]
肺炎克雷伯菌	荚膜多糖(K1和K2型)	rEPA	PglS	实验室阶段	[24]
金黄色葡萄球菌	荚膜多糖(5和8型)	rEPA/Hla	PglB	实验室阶段	[25]
痢疾志贺氏菌	O-抗原多糖	rEPA	PglB	I期临床	[14]
福氏志贺氏菌	O-抗原多糖	rEPA	PglB	I期临床	[26]
福氏志贺氏菌	O-抗原多糖	CTB	PglL	实验室阶段	[19]
大肠杆菌	O-抗原多糖(O1、O2、O6和O25)	rEPA	PglB	Ib期临床	[27]
大肠杆菌	O-抗原多糖(O157)	MBP	PglB	实验室阶段	[28]
土拉弗朗西斯菌	O-抗原多糖	rEPA	PglB	实验室阶段	[29]
类鼻疽伯克霍尔德菌	O-抗原多糖	AcrA	PglB	实验室阶段	[12]
伤寒沙门氏菌	O-抗原多糖	rEPA	PglL	实验室阶段	[30]
甲型副伤寒沙门氏菌	O-抗原多糖	CTB	PglL	实验室阶段	[31]
牛种布鲁氏菌	O-抗原多糖	CTB	PglL	实验室阶段	[32]

\* rEPA:重组铜绿假单胞菌外毒素A;PiuA:血红素结合脂蛋白;ComP:不动杆菌IV型菌毛蛋白;Hla:金黄色葡萄球菌 $\alpha$ 溶血素;CTB:霍乱毒素B亚单位;MBP:麦芽糖结合蛋白

影响这种疫苗的最终效果,因此以细菌自身蛋白为载体是一个理想的选择。如 Wacker 等报道的在制备金黄色葡萄球菌多糖结合疫苗时选用自身抗原  $\alpha$  溶血素(HIa)为载体蛋白并与荚膜多糖偶联,从而实现了对细菌感染的双重保护<sup>[25]</sup>,这种设计也是未来多糖结合疫苗优化的一个候选方向。

近年来的研究逐渐明确,疫苗颗粒的大小直接影响免疫效果,尤其是达到纳米级的颗粒疫苗在抗原递送等方面具有明显优势<sup>[33]</sup>。多种类型的纳米载体、病毒样颗粒以及活病毒载体等,能够实现高效的抗原递送,并激活较弱抗原的免疫应答,因此非常适合多糖这类半抗原的免疫效果提升。在我们的研究中也发现,以能够形成五聚体的霍乱毒素 B 亚单位(Cholera Toxin B Subunit, CTB)为载体蛋白制备的多糖结合疫苗,免疫效果明显优于以 rEPA 为载体制备的多糖结合疫苗<sup>[19, 31]</sup>。进一步分析发现,CTB 蛋白在天然状态下可组装成一个环状五聚体,其尺寸可达到 5 nm 左右;同时 CTB 还能够与抗原提呈细胞表面的神经节苷脂 GM1 结合,增强抗原提呈作用,发挥佐剂的功能<sup>[34]</sup>。在上述基础上,我们在 CTB 的末端融合了一个三聚体结构域,从而获得了尺寸达 20~30 nm 的六十聚体蛋白颗粒,由此制备的多糖结合疫苗具有更好的免疫效果<sup>[35]</sup>。因此这类具有佐剂效应且能够自组装为较大空间结构的载体蛋白非常具有应用潜力。

### 3.3 多糖的表达方式

病原细菌多糖来源目前主要有三种:一种是通过克隆多糖合成基因簇,构建表达载体后在大肠杆菌等工程菌中进行表达;另一种是将糖基化系统建立在目标宿主菌中,直接利用宿主菌表达的多糖制备疫苗;还有一种是人工设计,以类似结构的多糖合成基因簇为基础,通过关键酶的替换,对多糖结构进行改造,实现目标多糖的表达。第一种方法是目前较为主流的方法,其要求多糖合成基因簇的功能明确,且能够在大肠杆菌等工程菌中高效表达。由于该方法是在工程菌中制备疫苗,安全性更高,体系更成熟,具有较好的通用性;但这一制备方法也有不足,如无法制备多糖基因簇未知的病原细菌疫苗;另外,细菌多糖合成基因簇包含了几种到十几种酶,序列往往较长(大多超过 10 kb),构建表达载体并进行高效表达存在一定的难度。第二种方式是将糖基化系统建立在减毒目标病原菌中,利用宿主菌自身合成的多糖直接制备多糖结合疫苗。例如,我们已利用缺失了毒力大质粒以及 O-抗原连接酶的志贺氏

菌,制备了志贺氏菌多糖结合疫苗<sup>[19]</sup>。这一策略巧妙地避开了多糖合成基因簇克隆构建过程,并且能够保证多糖抗原的合成效率、天然结构与构象。但在这一策略中,首先需要对病原菌进行减毒,以适合大规模发酵。而第三种方式主要适用于未在脂载体 UndPP 上合成的多糖,如金黄色葡萄球菌 5 型和 8 型荚膜多糖,其合成过程是在脂载体——十一异戊二烯磷酸(Undecaprenyl Phosphate, UndP)上合成,不能被糖基转移酶识别。事实上,金黄色葡萄球菌荚膜多糖骨架结构与铜绿假单胞菌 O11 的 O-抗原(UndPP 上合成)结构类似,都为三糖结构的串联重复,主要区别在于第 3 个糖的不同以及第 2 个或第 3 个糖的乙酰化修饰。因此,在铜绿假单胞菌 O11 中多糖合成的基因簇的基础上,对相应的酶进行改造和替换,就可以合成能够被糖基转移酶 PglB 识别的金黄色葡萄球菌荚膜多糖<sup>[25]</sup>。这种研究策略也启示我们,未来可以建立病原细菌多糖合成相关的酶编码基因库,通过计算机辅助设计,利用合成生物学方法构建病原细菌多糖合成的全新路径,从而实现多糖抗原的定制合成。

## 4 生物法制备多糖结合疫苗的未来发展

当前乃至今后相当长时间内以多重耐药细菌为代表的细菌性传染病仍将严重威胁人类生命健康,并成为全球性问题。鉴于细菌表面多糖的特异性及其抗体的有效性,多糖结合疫苗已成为预防这类感染最有效的手段之一,越来越得到本领域专家的青睐。而随着合成生物学等生物技术的飞速发展,用生物法取代传统的化学法来合成多糖结合疫苗是时代发展的必然趋势。此外,多糖结合疫苗技术还可以进一步扩展其应用范围,如用于制备病毒疫苗和肿瘤疫苗。

尽管这一技术刚刚起步,但已展现出强大的优势及广阔的优化空间,以实现疫苗的不断升级换代,总结为以下几个主要方向:(1)酶的拓展与改造。随着多种具有宽松底物特异性的糖基转移酶的发现,生物法制备多糖结合疫苗的目标对象由早期只有革兰氏阴性细菌 OPS 已发展到涵盖了部分革兰氏阳性菌的 CPS 以及某些特殊的多糖,而随着研究的深入有望实现病原细菌胞外多糖的全覆盖。同时,利用结构生物学技术通过对几种不同糖基转移酶的结构和功能的不断解析,有望通过对酶的改造将不同糖基转移酶功能集成,实现一种酶即可识别多种不同特征的目标多糖。(2)载体蛋白的设计。载体蛋

白的设计是未来多糖结合疫苗升级改造的重要方面,有几个方向可以选择,包括以目标病原细菌自身蛋白抗原为载体的改造和载体尺寸的优化(如纳米化),前者可实现双重保护,而后者能够从免疫机制层面对多糖结合疫苗发挥的功能实现优化。(3)多糖的表达。目前细菌多糖合成涉及到一系列酶促反应,主要通过克隆表达或者自身合成,而合成生物学的发展使得模块化构建细菌多糖成为可能。随着参与细菌抗原性多糖的单糖组分、构象以及连接方式等的不断明确,未来可摆脱菌株限制,实现多糖的人工全新设计与合成。

### 参 考 文 献

- [1] Jones C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2005, 77(2): 293—324.
- [2] Rappuoli R. Glycoconjugate vaccines: principles and mechanisms. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(456): eaat4615.
- [3] Sun X, Stefanetti G, Berti F, et al. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(1): 193—198.
- [4] Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal center B cell dynamics. *Immunity*, 2016, 45(3): 471—482.
- [5] Feldman MF. Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, 2011, 21(2): 138—151.
- [6] Kay E, Cuccui J, Wren BW. Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines. *NPJ Vaccines*, 2019, 4: 16.
- [7] Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, 298(5599): 1790—1793.
- [8] Linton D, Dorrell N, Hitchen PG, et al. Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Molecular Microbiology*, 2010, 55(6): 1695—1703.
- [9] Kowarik M, Young NM, Numao S, et al. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO Journal*, 2006, 25(9): 1957—1966.
- [10] Wacker M, Feldman MF, Callewaert N, et al. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(18): 7088—7093.
- [11] Chen MM, Glover KJ, Imperiali B. From peptide to protein: comparative analysis of the substrate specificity of N-linked glycosylation in *C. jejuni*. *Biochemistry*, 2007, 46(18): 5579—5585.
- [12] Garcia-Quintanilla F, Iwashkiw JA, Price NL, et al. Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(5): 381.
- [13] Ihssen J, Haas J, Kowarik M, et al. Increased efficiency of *Campylobacter jejuni* N-oligosaccharyltransferase PglB by structure-guided engineering. *Open Biology*, 2015, 5(4): 140227.
- [14] Hatz CF, Bally B, Rohrer S, et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: a single blind, partially randomized phase I study. *Vaccine*, 2015, 33(36): 4594—4601.
- [15] Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, et al. Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8088—8098.
- [16] Faridmoayer A, Fentabil MA, Haurat MF, et al. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein O-glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50): 34596—34604.
- [17] Schulz BL, Jen FE, Power PM, et al. Identification of bacterial protein O-oligosaccharyltransferases and their glycoprotein substrates. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62768.
- [18] Julenius K, Molgaard A, Gupta R, et al. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 2005, 15(2): 153—164.
- [19] Pan C, Sun P, Liu B, et al. Biosynthesis of conjugate vaccines using an O-linked glycosylation system. *MBio*, 2016, 7(2): e00443—00416.
- [20] Natarajan A, Jaroentomeechai T, Cabrera-Sanchez M, et al. Engineering orthogonal human O-linked glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Nature Chemical Biology*, 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0595-9.
- [21] Harding CM, Nasr MA, Scott NE, et al. A platform for glycoengineering a polyvalent pneumococcal bioconjugate vaccine using *E. coli* as a host. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 891.
- [22] Adis Insight. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *streptococcus pneumoniae* when administered to adult and elderly healthy subjects. A Phase I randomized study. (2018-12-12)/[2020-04-29]. <https://adisinsight.springer.com/trials/700289302>.
- [23] Reglinski M, Ercoli G, Plumtre C, et al. A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Pevnar-13. *NPJ Vaccines*, 2018, 3(1): 53.

- [24] Feldman MF, Mayer Bridwell AE, Scott NE, et al. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(37): 18655—18663.
- [25] Wacker M, Wang L, Kowarik M, et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(10): 1551—1561.
- [26] Riddle MS, Kaminski RW, Di Paolo C, et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study. *Clinical Vaccine Immunology*, 2016, 23(12): 908—917.
- [27] Huttner A, Gambillara V. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018, 24(10): 1046—1050.
- [28] Ma Z, Zhang H, Shang W, et al. Glycoconjugate vaccine containing *Escherichia coli* O157: H7 O-antigen linked with maltose-binding protein elicits humoral and cellular responses. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105215.
- [29] Marshall LE, Nelson M, Davies CH, et al. An O-antigen glycoconjugate vaccine produced using protein glycan coupling technology is protective in an inhalational rat model of tularemia. *Journal of Immunology Research*, 2018, (3): 1—12.
- [30] 彭哲慧, 潘超, 孙鹏, 等. 生物法合成伤寒 O-糖蛋白结合疫苗及其免疫原性评估. *遗传*, 2015, 37(5): 474—479.
- [31] Sun P, Pan C, Zeng M, et al. Design and production of conjugate vaccines against *S. Paratyphi a* using an O-linked glycosylation system in vivo. *NPJ Vaccines*, 2018, 3: 4.
- [32] Huang J, Pan C, Sun P, et al. Application of an O-linked glycosylation system in *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 to generate a new candidate vaccine against *Brucella abortus*. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 436.
- [33] Smith DM, Simon JK, Baker JR, et al. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(8): 592—605.
- [34] Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant—an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. *Vaccines*, 2015, 3(3): 579—596.
- [35] Pan C, Wu J, Qing S, et al. Biosynthesis of self-assembled proteinaceous nanoparticles for vaccination. *Advanced Materials*, 2020, doi: 10.1002/adma.202002940.

## Recent Advances in Preparation of Bacterial Polysaccharide Conjugate Vaccines by Biosynthetic Method

Pan Chao    Zhu Li    Wang Hengliang\*

*Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071*

**Abstract** The polysaccharide conjugate vaccine is considered to be one of the most successful bacterial vaccines at present, and has played a huge role in preventing infectious diseases in humans. However, the chemical method for preparing polysaccharide conjugate vaccines is a multi-step, complex process, which has the disadvantages of high cost, low product uniformity and environmental pollution. In recent years, emerging biosynthetic method strategies are expected to solve the deficiencies of chemical ones. This method only needs one step to produce polysaccharide conjugate in vivo using protein glycosylation system and could provide more choices for the rational design of further development. This article reviews the latest progress in the preparation of polysaccharide conjugate vaccines by biosynthetic method, and puts forward the key points of this method, which provides directions for the design and optimization of polysaccharide conjugate vaccines in the future.

**Keywords** polysaccharide conjugate vaccines; biosynthesis; protein glycosylation; pathogenic bacteria

(责任编辑 张强)

\* Corresponding Author, Email: wanghl@bmi.ac.cn