

说明书

发明名称: 新型Endo S2突变体酶

[0001] 本申请要求于2023年11月10日提交中国专利局、申请号为CN2023115016001、发明名称“新型Endo S2突变体酶”的中国专利申请，2024年10月31日提交中国专利局、申请号为CN202411548065X、发明名称“新型Endo S2突变体酶”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本公开涉及糖化学和酶学领域，具体地涉及使用重组的新型Endo S2突变体酶对多肽或蛋白质进行糖链改造，改造后的蛋白质例如抗体可用于抗体药物偶联物的糖定点偶联。

背景技术

[0003] 抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugates, ADC)是采用接头将细胞毒素连接到抗体上，从而利用抗体对肿瘤相关抗原的特异性靶向作用和连接细胞毒素的高效负载能力，实现细胞毒素的靶向运输和富集，精确杀伤肿瘤细胞。因此，与传统化疗药物相比，ADC具备更低的副作用、更广泛的治疗效果和更高的治疗指数，已经成为近年来发展最快的药物之一。传统的ADC偶联方法是利用抗体中丰度较高、暴露程度好的赖氨酸(Lys)或半胱氨酸(Cys)连接细胞毒素。这种随机偶联方式会导致ADC的异质性，即细胞毒素偶联位点、偶联数量不均一，对药代动力学、耐受性、有效性等参数产生负面影响。后续发展的定点偶联技术，如特定氨基酸修饰技术(THIOMAB技术)、非天然氨基酸插入技术、糖定点偶联技术、酶催化偶联技术等，都各有其优缺点。

[0004] 典型的IgG抗体由两条轻链、两条重链构成，四条链组成三个不同的结构域，包括两个可变的Fab结构域(用于识别和结合抗原)和一个恒定的Fc结构域(与受体细胞表面的Fc γ R结合，介导抗体与宿主细胞的相互作用)。几乎所有治疗性抗体的同源二聚体的Fc结构域中都存在297位天冬酰胺(N297)的N-聚糖修饰，这种保守的糖基化位点可以作为细胞毒素的偶联位点，并以此为基础开发了糖定点偶联技术。糖定点偶联技术的优势在于，Fc结构域的N297聚糖位点远离Fab结构

域，避免了偶联后的抗体对抗原结合能力下降的风险，同时，偶联方法也无需对抗体的氨基酸序列进行设计和改造，也降低了免疫原性的风险。

[0005] 糖苷内切酶，也称内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶，是一种糖苷水解酶，作用于 β -1,4-糖苷键，近年来逐渐成为抗体糖工程改造的研究重点，也被发现具备糖基转移活性，可用于ADC糖定点偶联技术。糖苷内切酶来源广泛，包括来自于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Endo S，来自脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)的Endo F1、Endo F2、Endo F3，来自血清型M49化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Endo S2等等。其中，Endo S2具备更为广泛的底物特异性，可以识别并作用于复杂型聚糖(Endo S不可以)、高甘露糖聚糖(Endo S不可以)、复杂的多触角聚糖(Endo F1不可以)、核心非岩藻糖基化聚糖(Endo F3不可以)、核心岩藻糖基化聚糖，因此Endo S2在糖定点偶联制备ADC领域极具潜力。但是，Endo S2属于糖苷酶GH18家族，更多呈现糖苷水解活性，转糖基活性较低，无法应用于ADC的生产。因此，急需获得具备显著增强的转糖基活性、保留大部分水解活性的Endo S2突变体，以有利于采用一步法进行抗体糖基化重塑和糖定点偶联以制备ADC药物。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开提供了一种重组的Endo S2突变体酶，其表现为具备增强的转糖基活性并同时保留大部分水解活性，能够对包含N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖基改造，包括糖型水解和糖链重构，因此，其可适用于抗体或其Fc片段的一步法糖定点偶联，例如用于ADC药物或包含抗体的检测药物的合成，所制备的ADC药物具备递送细胞毒素等治疗剂的功能，对目标细胞有更强的杀伤作用。

[0008] 本公开的重组的Endo S2突变体酶衍生自血清型M49化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)NZ131菌株的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo S2)，其野生型酶的序列为SEQ ID NO: 1所示，根据文献(Tiezheng Li et al, Glycosynthase mutants of endoglycosidase S2 show potent transglycosylation activity and remarkably relaxed substrate specificity for antibody glycosylation remodeling, 2018-12-22)的记载，Endo S2在保留SEQ ID NO: 1的第38位至819位的连续氨基酸的基础上就可以满足其水解和转糖活性，即，SEQ ID NO: 1的第38位至819位为Endo S2的已知的活性片

段，包含SEQ ID NO：1的第38位至819位并且仍具备水解和转糖活性的酶的各种截短片段都在本公开的范围之内。

- [0009] 本公开的Endo S2突变体酶，优选地采用定点突变的方式，在SEQ ID NO：1的序列或与SEQ ID NO：1具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列或在包含SEQ ID NO：1的第38至819位的连续氨基酸序列中具有如下1或2个氨基酸位置处的突变：Y70、F106、G140、R176、D179、Q250、Y252、S285、E288、Y339，优选为R176和/或D179。
- [0010] 在一些优选的实施方式中，本公开的Endo S2突变体酶在与SEQ ID NO：1具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列中具有如下1或2个氨基酸位置处的突变：Y70、F106、G140、R176、D179、Q250、Y252、S285、E288、Y339，优选为R176和/或D179。
- [0011] 更进一步地，在一些优选的实施方式中，所述突变选自如下的至少一种：Y70F、F106W、F106Y、G140N、R176Y、D179A、Q250Y、Q250F、Y252F、S285D、S285A、E288F、E288R、Y339F、R176Y/D179A，更优选地，所述突变为R176Y和/或D179A。包含任何上述Endo S2突变体酶的结构域和片段都包括在本公开中，其中任何这样的结构域和片段可以与其他蛋白质融合，其他蛋白质包括但不限于CPD、Fc、MBP等。所述突变体的蛋白可以被修饰或截短，包括但不限于N-端、C-端。在一些实施方式中，所述突变体的M1至E37之间的至少一个氨基酸之前的序列可以从N-端切割而删除，和/或，所述突变体的Y820至D843之间的至少一个氨基酸之后的序列可以从C-端切割而删除。
- [0012] 基于前述本公开的Endo S2突变体酶的功能，其可用于含有N-聚糖的多肽或蛋白质的糖基改造。更具体地，其可用于重塑抗体的糖型，或用于糖蛋白的糖链重构，或用于制备包含抗体的检测药物或ADC药物。
- [0013] 本公开提供了一种利用一步法对含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖链重塑的方法，包括以下步骤：
- [0014] (a)引入本公开的Endo S2突变体酶；
- [0015] (b)引入含有N-聚糖的多肽或蛋白质作为底物；
- [0016] (c)提供糖链连接子供体；和

- [0017] (d)利用所述的Endo S2突变体酶将含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖苷水解并将糖链连接子供体转移至糖苷水解产物上，以提供糖链改造的新多肽或蛋白质；
- [0018] 所述一步法不含有对糖苷水解产物的纯化步骤。
- [0019] 所述一步法正是利用了本公开的Endo S2突变体酶兼具糖苷水解和转糖基活性的特点，在同一反应步骤中，同时完成脱糖基和转糖基，这样就可省略在糖苷水解后进一步对糖苷水解产物进行纯化的步骤，在产业上操作更便捷，效率更高。
- [0020] 同时，本公开也提供了一种利用两步法对含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖链重塑的方法，其引入两次酶，分别进行糖苷水解和转新糖基，其中，本公开的Endo S2突变体酶至少在糖苷水解或转新糖基的一个步骤中使用，所述方法包括以下步骤：
- [0021] (a)引入本公开的Endo S2突变体酶或其他适用的内切糖苷水解酶；
- [0022] (b)引入含有N-聚糖的多肽或蛋白质作为底物，在(a)步骤的酶作用下进行糖苷水解，从而提供糖苷水解产物作为下一步转新糖基的受体；
- [0023] (c)提供糖链连接子供体；和
- [0024] (d)通过所述的Endo S2突变体酶或其他适用的糖基转移酶将糖链连接子供体转移至受体上以生成糖链改造的新多肽或蛋白质；
- [0025] 任选地，在(b)和(c)步骤之间还含有对糖苷水解产物的纯化步骤。
- [0026] 所述的两步法是先利用内切糖苷水解酶完成水解的脱糖基反应，此步骤中可选择本公开的Endo S2突变体酶，也可以选择其他适用的酶；接下来再利用转糖基酶进行转糖基反应，此步骤中可选择本公开的Endo S2突变体酶，也可以选择其他适用的酶；Endo S2突变体酶至少在糖苷水解或转新糖基的一个步骤中使用。并且，在脱糖基步骤之后可根据需要决定是否对糖苷水解产物进行纯化。
- [0027] 进一步地，所述含有N-聚糖的多肽或蛋白质包括但不限于天然存在的抗体、重组抗体、抗体的Fc片段或唾液酸糖肽。

- [0028] 进一步地，所述其他适用的内切糖苷水解酶包括但不限于以下野生型酶及其突变体：Endo S、Endo S2、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo A、Endo D、Endo M。
- [0029] 进一步地，所述其他适用的糖基转移酶包括但不限于以下野生型酶及其突变体：Endo S、Endo S2、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo A、Endo D、Endo M。
- [0030] 更进一步地，所述糖链连接子供体，包括但不限于天然N-聚糖噁唑啉或合成聚糖噁唑啉，优选地，利用二、三、四、五、六、七、八、九、十或十一糖噁唑啉及其特定衍生物作为转糖基化的供体，特别优选二糖噁唑啉。所述天然N-聚糖噁唑啉包含复杂型聚糖噁唑啉、高甘露糖聚糖噁唑啉、或杂合噁唑啉。在一些实施方式中，糖链连接子的选择性衍生类型包括但不限于糖基氟化物、糖基叠氮修饰或芳基聚糖等，其标签部分，包括但不限于治疗性药物、毒素物质、荧光探针、生物素、脂质、抗原片段及其类似物、PEG物质、基因及其类似物、RNA及其类似物、DNA及其类似物、多肽、蛋白质及其类似物、酶、酶底物、酶抑制剂、酶调节剂或抗体片段。在一些实施方式中，糖链连接子还有另外的修饰方法，其可以是叠氮化、醛基化、炔基化、巯基化、羟基化、羧化、磷酸化、唾液酸化、白蛋白化、法尼基化或缀合至聚合物的修饰。
- [0031] 进一步地，所述糖苷水解产物在包含N-聚糖的多肽或蛋白质发生糖苷水解后，肽链上剩余N-乙酰葡萄糖胺或核心岩藻糖基化N-乙酰葡萄糖胺作为下一步转糖基的反应位点。
- [0032] 更进一步地，本公开还提供了使用所述糖链改造方法生成的抗体及其ADC药物。
- [0033] 在一些实施方式中，本公开提供了一种多核苷酸，其编码本公开所述的Endo S2突变体酶。
- [0034] 在一些实施方式中，本公开提供了一种载体，其包含本公开所述的多核苷酸。
- [0035] 在一些实施方式中，本公开提供了一种宿主细胞，其用本公开所述的载体转化。

附图说明

- [0036] 图1是Endo S2与CPD蛋白、His-tag标签的蛋白融合表达重组质粒示意图。
- [0037] 图2展示了单抗1脱糖基化处理的ESI-MS分析。(A)单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (B)脱糖基化的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后)。
- [0038] 图3展示了野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性的检测结果。
- [0039] 图4展示了一种叠氮修饰的二糖连接子噁唑啉的结构。
- [0040] 图5展示了核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的GlcNAc-单抗1转糖基处理的ESI-MS分析。(A)GlcNAc-单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (B)转糖基化的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后)。
- [0041] 图6展示了野生型Endo S2及其突变体的转糖基活性的检测结果。
- [0042] 图7展示了野生型Endo S2及其优选突变体对单抗2的糖苷水解和转糖基活性的检测结果。
- [0043] 图8展示了Endo S2优选突变体对单抗1转糖基产物累积数据。
- [0044] 图9展示了Endo S2优选突变体对单抗1转糖基体系反应20h的结果。
- [0045] 图10展示了Endo S2优选突变体直接对完整抗体1进行糖型塑造的结果。(A)对照组, 完整单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (B)突变体T138Q处理后的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (C)突变体D184M处理后的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (D)突变体R176Y处理后的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (E)突变体D179A处理后的单抗1的重链的ESI-MS(在解卷积之后)。
- [0046] 图11展示了Endo S2优选突变体直接对完整抗体2进行糖型塑造的结果。(A)对照组, 完整单抗2的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (B)突变体T138Q处理后的单抗2的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (C)突变体D184M处理后的单抗2的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (D)突变体R176Y处理后的单抗2的重链的ESI-MS(在解卷积之后); (E)突变体D179A处理后的单抗2的重链的ESI-MS(在解卷积之后)。
- [0047] 具体实施方法
- [0048] 除非特别定义, 本公开中所使用的是免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因工程和蛋白质工程中的常规技术, 本公开所使用的学术用语具有本公开所述领域技术人员通常理解的含义。在本公开中提及的所有出版物和专利文件可被视为所属技术领域具有通常知识者的提示。

- [0049] 本文所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.Biol.Chem., 243, p3558(1968)中所述。
- [0050] 本公开的突变体酶是由重组DNA技术获得的, 术语“突变体”或“突变体酶”可以互用, 均指突变后的重组酶, 其化学本质仍是一种蛋白质分子, 并且具有与野生型酶相区别的序列特征。
- [0051] 本公开的分子中含有的氨基酸的注释符合本领域的习惯, 并且突变的位置由野生型氨基酸的单字符符号及其编号所指明, 例如, 在位置176的Arg被称为“R176”。突变由野生型氨基酸的单字符符号、其编号和突变后的氨基酸的单字符符号所指明, 例如, 用Tyr取代位置176的Arg的突变被称为“R176Y”, 并且, 如果突变体具有多个突变, 多个突变之间使用分隔符“/”指明。
- [0052] 在本公开中, Endo S2突变体R176是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置176的Arg被其他天然氨基酸取代的序列所组成的突变体。Endo S2突变体D179是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置179的Asp被其他天然氨基酸取代的序列所组成的突变体。Endo S2突变体R176/D179是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置176的Arg被其他天然氨基酸取代同时位置179的Asp被其他天然氨基酸取代的序列所组成的突变体。
- [0053] 在本公开中, Endo S2突变体R176Y是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置176的Arg被Tyr取代的序列所组成的突变体。Endo S2突变体D179A是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置179的Asp被Ala取代的序列所组成的突变体。Endo S2突变体R176/D179是由如SEQ ID NO:1所示的野生型Endo S2的位置176的Arg被Tyr取代同时位置179的Asp被Ala取代的序列所组成的突变体。
- [0054] 本公开的突变体不必具有全长序列, 只要保留了对于EndoS2的转糖活性重要的区域均在本公开的范围内, Endo S2已知的活性片段为SEQ ID NO:1的第38至819位的氨基酸序列, 在此基础上, 包含所述片段并且在其N端或C端适当增加例如信号肽序列、纯化标签(例如His-tag)、接头序列(例如GGGS)或其他功能组分形成新的融合蛋白但不影响Endo S2活性发挥的重组蛋白均属于本公开的保护范围。

- [0055] 在本公开的突变体的氨基酸序列中，可以在不影响酶活性的程度上，在除了下述必需突变的位置以外的位置取代、缺失、插入和/或添加一个至几个氨基酸，其中，优选为与SEQ ID NO: 1具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列。任何位置都可以选择用于此类氨基酸改变，只要其不影响酶活性，但该位置优选为SEQ ID NO:1的氨基酸编号38至819以外的位置。在本公开中，术语“几个”是指20个或更少个，优选10个或更少个，进一步优选5个或更少个，最优选4个、3个、2个或1个。
- [0056] 本文所使用的“同一性”是指在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后，候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定氨基酸序列同一性，例如，使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNAST AR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。
- [0057] 当在本公开说明书中使用，不带具体数量的指称可以意味着一个或多个。在本公开权利要求中使用，当结合词语“包含”使用时，不带具体数量的指称可以意味着一个或多个。当在本公开中使用， “另一个”可以意味着至少第二个或更多。
- [0058] 如本文所用的“糖”指的是氧化或未氧化的含有碳水化合物的分子，包括但不限于单糖、二糖、三糖、低聚糖、或多糖，包括例如L-异构体或D-异构体的N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖、半乳糖、N-乙酰神经氨酸(唾液酸)、葡萄糖、果糖、岩藻糖、山梨糖、鼠李糖、甘露庚酮糖、N-乙酰半乳糖胺、二羟基丙酮、木糖、木酮糖、阿拉伯糖、甘油醛、蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖或其任何组合。糖还指天然、重组、合成和/或半合成产生的这样的分子。
- [0059] 如本文所使用的，“糖链连接子”作为糖基偶联的活化的供体分子，可以是合成的聚糖噁唑啉，例如具有还原末端经活化的寡糖、优选具有经噁唑啉结构化的寡糖分子；也可以是天然的N-聚糖噁唑啉。糖链连接子还可以被化学修饰，

例如通过叠氮化、炔基化、醛基化、巯基化等引入官能团，从而更有利于细胞毒素的装载，以产生ADC偶联抗体。

- [0060] 如本文所用的“抗体”、“单克隆抗体”或“IgG”指的是含有特异性结合抗原的抗原结合位点或结合细胞受体的Fc区域的分子，其可互换使用。
- [0061] 如本文所用的“高纯度的”指得是目的蛋白与其在天然状态下伴随着它的那些污染物或在获得目的蛋白过程中产生或使用的那些污染物分离的。通常，凝胶电泳分离后目的蛋白条带灰度占有所有条带总灰度至少90%，所述目的蛋白是高纯度的。优选地，在某些实施方法中，目的蛋白灰度占有所有条带总灰度至少95%，最优选地至少98%。
- [0062] 如本文所用的“大部分水解活性”指的是以野生型Endo S2的糖苷水解活性为100%，相同条件下测定Endo S2突变体的水解活性为野生型Endo S2水解活性的至少50%，优选地为至少60%，更优选地为至少70%，最优选地为至少80%。
- [0063] 核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的糖蛋白是重要的分子类别，其在许多生物事件例如肿瘤转移、细胞粘附、病原体感染和免疫应答中发挥关键作用。天然和重组的岩藻糖基化和非岩藻糖基化的糖蛋白通常作为仅在侧链寡糖的结构方面不同的糖型的混合物被生产。
- [0064] 按照本文描述的方法生产核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的衍生化糖链偶联抗体，其衍生化所引入的官能团包括但不限于叠氮基团、醛基、炔基和巯基，上述基团可通过化学反应引入细胞毒素以产生ADC偶联抗体。
- [0065] 本公开进一步提供编码具有上述EndoS2突变体的重组基因，包含该重组基因的基因构建体诸如质粒或表达载体，用该基因构建体转化的宿主细胞，产生本公开的突变体的方法，其包括从宿主细胞的培养物中收集本公开的突变体的步骤等。所述重组基因、基因构建体、宿主细胞等可以根据已知基因工程改造技术基于本公开的突变体的氨基酸序列来制备。
- [0066] 可以根据细胞的种类在适当的条件下培养通过引入编码本公开的突变体的基因而转化的宿主细胞(可以适当地选择通常用于蛋白生产的细胞，诸如动物细胞、植物细胞、大肠杆菌、酵母等)，并且可以从培养物中收集本公开的突变体。突变体的收集通过适当地基于蛋白质的物理性质组合常规纯化技术来进行。为了

促进收集，可以设计基因构建体，以具有标签肽诸如GST的形式表达突变体，所述标签肽预先与突变体连接以使得可能使用与标签肽的亲合力进行收集。所述标签肽可以在纯化后除去，但当其对突变体的酶活性没有影响时，可以使用具有与之连接的标签肽的突变体用于反应诸如糖重构。本公开的突变体包括这样的氨基酸序列，其含有与之连接的标签肽。

[0067] 通过以下非限制性实施例更充分展示本公开的特征和优势。

实施例

[0068] 材料和方法

[0069] 本公开中所使用的单抗1、单抗2为本申请人自行生产的抗体。叠氮修饰的二糖连接子LacNAc噁唑啉(N3-LacNAc-Oxa)购自武汉糖智药业有限公司，其余试剂未做特殊说明均为Merck、Sigma、国药集团等生产的常规试剂。本公开中所使用的填料、色谱柱、仪器包括：Cytiva Ni Sepharose Excel填料，Cytive HiLoad™ 26/600Superdex™ 200pg色谱柱，Acquity I-Class/RDa(Waters)液相色谱质谱连用仪，ACQUITY UPLC BEH PROTEIN C4柱(Waters, 1.7 μm, 2.1mm × 50mm)色谱柱。重组Endo S2野生型酶及其突变体酶的定点突变、表达和纯化

[0070] 通过PCR扩增，将编码源自血清型M49化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)NZ131菌株的Endo S2氨基酸序列的cDNA与编码霍乱弧菌MARTX毒素的半胱氨酸蛋白酶结构域(CPD)的cDNA融合，并在C-端连接His-tag标签蛋白(10 × His)，一起插入到载体质粒pET-22b(+)多克隆位点区域的SalI和NotI之间。以包含突变的引物引入突变氨基酸的密码子，通过大肠杆菌DH5 α 菌株生产包含野生型Endo S2及其突变体核酸序列的重组质粒，转化到大肠杆菌BL21(DE3)细胞中，通过加入终浓度为0.25mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷酶(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)并20℃过夜培养实现EndoS2-CPD-10 × His融合蛋白(以下简称Endo S2融合蛋白)的表达。离心收集细胞，重悬于裂解缓冲液(20mM PB, 500mM NaCl, pH 7.5)中，然后通过超声波细胞粉碎机(无锡杰瑞安仪器设备有限公司)破碎细胞。离心后收集细胞裂解液上清液，用Ni Sepharose Excel填料(Cytiva)纯化Endo S2融合蛋白。用Amicon离心过滤器(30kDa, Millipore)浓缩，并且进一步经过HiLoad™ 26/600Superdex™ 200pg色谱柱(Cytiva)通过尺寸排阻法进行纯

化。含Endo S2融合蛋白的组分用Amicon离心过滤器(30kDa, Millipore)浓缩, 保存在储存缓冲液(20mM PB, pH 7.5)中。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳和凝胶成像仪(Gel Doc EZ Imager, Bio-RAD)、Image Lab扫描软件分析蛋白纯度, 并使用分光光度计(Nano-300)定量蛋白浓度。

[0071] IgG的液相色谱质谱(LC-ESI-MS)

[0072] 在Acquity I-Class/RDa(Waters)上进行LC-MS分析。为了分析抗体重链, 用20mM TCEP处理IgG抗体并且在37℃下加热30分钟, 然后使用ACQUITY UPLC BEH PROTEIN C4柱(1.7 μ m, 2.1mm $\times$ 50mm)用含有0.1%甲酸的20%-50%线性梯度的MeCN以0.3mL/min的流速在15分钟内进行分析。使用UNIFI(Waters)将原始数据解卷积。

[0073] 制备GlcNAc-单抗1、GlcNAc-单抗2

[0074] 将完整的单抗1溶解于20mM磷酸盐, 150mM NaCl, pH 8.0的缓冲液中(10mg/mL), 加入终浓度为0.4mg/mL的野生型Endo S2, 37℃孵育3小时。通过LC-MS分析表明重链上N-聚糖的完全切割后, 通过蛋白A色谱法将脱糖基化的单抗1纯化。LC-MS数据: m/z: 49354 $\pm$ 2Da(解卷积数据), 为非岩藻糖糖基化单抗1(即GlcNAc-单抗1)的重链; m/z: 49500 $\pm$ 2Da(解卷积数据), 为核心岩藻糖基化单抗1(即Fuc α 1,6-GlcNAc-单抗1)的重链。

[0075] GlcNAc-单抗2制备方法同上, LC-MS数据: m/z: 49285 $\pm$ 2Da(解卷积数据), 为非岩藻糖糖基化单抗2(即GlcNAc-单抗2)的重链; m/z: 49431 $\pm$ 2Da(解卷积数据), 为核心岩藻糖基化单抗2(即Fuc α 1,6-GlcNAc-单抗2)的重链。

[0076] 野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性测定

[0077] 在37℃下用10mg/mL完整的单抗(例如单抗1或单抗2)作为底物, 在20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.5)体系中测定野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性, 反应混合物通过加入终浓度为0.1%甲酸进行终止, 然后通过还原LC-MS进行分析。将重链ESI-MS原始数据解卷积并且对相应的MS峰进行积分后, 定量底物(单抗1)和糖苷水解产物(脱糖基化单抗1)的相对量以计算野生型Endo S2及其突变体糖苷水解活性变化。

[0078] Endo S2野生型及其突变体转糖基活性测定

[0079] 将10mg/mL的脱糖基化单抗(例如包含核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的GlcNAc-单抗1或GlcNAc-单抗2)、N3-LacNAc-Oxa(3.33mM, 50当量)与适量野生型Endo S2或其突变体在30℃、20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.5)体系中孵育, 加入终浓度为0.1%甲酸进行终止并通过还原LC-MS进行分析。

[0080] Endo S2突变体的转糖基产物累积

[0081] 在30℃、20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.5)体系中将脱糖基化单抗1(10mg/mL, 包含核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化GlcNAc-单抗1)、N3-LacNAc-Oxa(3.33mM, 50当量)、200nM Endo S2突变体混匀, 梯度时间取等分反应混合物, 加入终浓度为0.1%甲酸进行终止, 然后通过还原LC-MS进行分析。

[0082] Endo S2突变体直接对完整抗体的转糖基

[0083] 往20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中加入N3-LacNAc-Oxa、完整单抗(例如单抗1或单抗2)和Endo S2突变体, 上述各组终浓度为3.33mM、10mg/mL和0.2mg/mL, 30℃孵育3h后加入终浓度为0.1%甲酸进行终止, 同时设置不加糖苷内切酶的对照组去除干扰。上述样品通过还原LC-MS进行分析。

[0084] 实施例1: 制备野生型Endo S2和Endo S2突变体的重组蛋白

[0085] 内切-β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(ENGase)(EC 3.2.1.96)基本可分为GH85和GH18家族, 它们遵循基本一致的催化机制。所述GH85糖苷内切酶包括Endo A、Endo M, 所述GH18糖苷内切酶包括Endo S, 同时还包括来自脑膜脓毒黄杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)的Endo F1、Endo F2、Endo F3, 来自血清型M49化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Endo S2。这些GH18糖苷内切酶以对IgG抗体的297位天冬酰胺-键合双分支聚糖产生GlcNAc-Ig的高效水解而被广为认知, 其中Endo S2因其广泛的底物特异性而备受关注。这些酶在具备糖苷水解活性的同时, 还具备转糖基活性, 可以作为糖定点偶联技术的潜在优势酶类。参考同家族酶Endo S、Endo F1、Endo F2、Endo F3的催化机制, 推测Endo S2的催化过程也涉及了形成噁唑啉鎓离子中间体的底物辅助机制。即Endo S2的184位天冬氨酸(Asp)作为一般酸使糖苷氧质子化, GlcNAc的2-乙酰胺基团作为亲核试剂取代异头中心的离去基团, 导致形成噁唑啉离子中间体, 然后186位谷氨酸(Glu)侧链

的催化羧酸盐残基作为通用碱激活水分子或糖基供体，最后噁唑啉中间体与活化的供体反应进行糖苷水解或转糖基反应。Endo S2的底物结合模式也已经通过晶体结构展示，包括与高甘露聚糖的晶体结构(PDB ID: 6MDV)和与复杂双触角聚糖的晶体结构(PDB ID: 6MDS)。

[0086] 基于上述催化机制和底物结合模式，为探究Endo S2的转糖基化作用，以催化活性位点周围残基以及与底物相互作用残基为切入点，本公开选择在Y70、F106、G140、R176、D179、Q250、Y252、S285、E288、Y339位置上进行定点突变，包括但不限于Y70F、F106W、F106Y、G140N、R176Y、D179A、Q250Y、Q250F、Y252F、S285D、S285A、E288F、E288R、Y339F、R176Y/D179A，上述的突变位置是对应于SEQ ID NO: 1序列而表示的。野生型Endo S2及其突变体通过在C-端融合CPD蛋白并添加His-tag标签蛋白在大肠杆菌(E.coli)中进行重组表达(见图1)，所述重组蛋白被简称为Endo S2融合蛋白，可以通过Ni Sepharose Excel亲和填料进行纯化，含有目标蛋白的组分可进一步通过HiLoadTM 26/600 SuperdexTM 200pg色谱柱进行精纯，获得高纯度的Endo S2融合蛋白。

[0087] 实施例2：野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性检测

[0088] 采用单抗1作为底物以检测野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性。单抗1主要的Fc聚糖是核心岩藻糖基化的双分支复杂型低聚糖，其携带0、1或2个半乳糖部分，分别被命名为G0F糖型、G1F糖型和G2F糖型。用野生型Endo S2融合蛋白对单抗1进行脱糖基化处理，脱糖基化过程和结果通过还原LC-MS检测，得到彻底脱糖基化的单抗1。如图2所示，图2A中单抗1重链的ESI-MS解卷积数据给出了4种主要的不同m/z物质，即 50448 ± 2 、 50595 ± 2 、 50757 ± 2 和 50919 ± 2 ，分别与重链的G0(核心非岩藻糖基化并携带0个半乳糖)、G0F、G1F、G2F糖型相对应；图2B为单抗1脱糖基化结果，重链ESI-MS的解卷积数据在 $49354 \pm 2\text{Da}$ 和 $49500 \pm 2\text{Da}$ 处显示两种物质，分别与GlcNAc糖型和岩藻糖基化糖型匹配。上述结果确认了野生型Endo S2对完整IgG优秀的糖苷水解活性，暗示了它可用于抗体糖定点偶联的第一步——抗体的脱糖基化处理。

[0089] 以完整的单抗1为底物(包含核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的完整单抗1)，测定了野生型Endo S2及其突变体的糖苷水解活性。如图3所示，相对于野生型End

o S2, 突变体Y70F、F106Y、G140N、R176Y、D179A和R176Y/D179A保留了大部分糖苷水解活性, 也可用于脱糖基化抗体制备; 而突变体F106W、Q250Y、Q250F、Y252F、S285D、S285A、E288F、E288R和Y339F具有显著降低的糖苷水解活性, 尤其是E288F和E288R几乎丧失所有糖苷水解活性。

[0090] 实施例3: 野生型Endo S2及其突变体的转糖基活性检测

[0091] 以核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的GlcNAc-单抗1作为受体, 叠氮修饰的LacNAc二糖连接子噁唑啉(N3-LacNAc-Oxa, 结构见图4)作为供体来检测野生型Endo S2及其突变体的转糖基活性。野生型Endo S2融合蛋白转糖基数据分析如图5所示, 图5A为脱糖基化单抗1结果, 重链ESI-MS的解卷积数据在 $49354 \pm 2\text{Da}$ 和 $49500 \pm 2\text{Da}$ 处显示两种物质, 分别为GlcNAc糖型和岩藻糖基化糖型; 图5B的ESI-MS数据中增加了 $49776 \pm 2\text{Da}$ 和 $49922 \pm 2\text{Da}$ 两种物质, 该结果与N3-LacNAc-Oxa转糖基连接后(酸性条件下叠氮降解并质子化后)的分子量匹配良好。

[0092] 转糖基活性结果如图6所示, 突变体R176Y、D179A呈现出显著增加的转糖基活性, 突变体G140N、Q250F、Y339F和R176Y/D179A的转糖基活性与野生型相比差异不大, 而突变体Y70F、F106W、F106Y、Q250Y、Y252F、S285D、S285A、E288F和E288R则丧失大部分转糖基活性。结合实施例2中糖苷水解活性检测结果, 令人惊喜的发现, R176Y和D179A这2个突变体在具有显著增强的转糖基活性的同时也保留了大部分糖苷水解活性。

[0093] 同时, 本公开也测定了优选突变体R176Y、D179A对单抗2的糖苷水解活性和转糖基活性, 如图7所示。图7A展示了优选突变体的糖苷水解活性, R176Y的水解活性与野生型相当, D179A的水解活性略有增加, 表明突变体R176Y、D179A至少保留了大部分水解活性; 图7B展示了突变体的转糖基活性, 与野生型相比, R176Y和D179A对单抗2的转糖基活性有显著增加。综上, 突变体R176Y与D179A在单抗1、单抗2的活性检测中, 均保留了大部分糖苷水解活性, 并同时具备显著增加的转糖基活性, 说明本公开的优选突变体对抗体底物具备普适性。

[0094] 随后进行优选突变体R176Y、D179A对单抗1的转糖基产物累积实验, 结果如图8所示, 突变体R176Y、D179A均能高效完成转糖基产物累积, 在4h已经完成大于80%抗体的糖苷化。同时, 反应20h的样品仍然具备100%的转糖基抗体1(图

9), 表明R176Y、D179A保留的水解活性不影响糖型塑造后抗体的稳定, 并且都能实现100%转糖基抗体产物的生成。因此, 同时具备糖苷水解活性和转糖基活性的突变体R176Y、D179A不影响其在转糖基领域的应用, 其可以完成抗体糖定点偶联的两个步骤——抗体脱糖基化和糖链连接子偶联。

[0095] 实施例4: 野生型Endo S2及其突变体直接对完整抗体进行一步法糖型塑造

[0096] 前述实施例中单抗1的糖型塑造分为两步, 先利用Endo S2野生型或其突变体进行抗体脱糖基化处理, 然后再用糖苷水解酶催化偶联N3-LacNAc-Oxa, 以上两步法可以为ADC药物制备具有生物正交反应基团的抗体, 但是在脱糖基化后还要进行脱糖基抗体的纯化, 操作复杂, 工艺繁琐。因此, 用本公开中筛选的R176Y和D179A突变体尝试以一步法(即抗体脱糖基化和糖链连接子偶联在一步中完成)完成对完整单抗的糖型塑造。同时, 将目前已知的最佳糖苷合成酶——Endo S2 T138Q突变体和D184M突变体作为一步法的对照(T138Q突变体和D184M突变体参见专利申请CN110234341A和CN109071630A)。

[0097] 对完整单抗1一步法糖型重塑的结果如图10所示。图10A为不加糖苷内切酶的对照组, 单抗1重链的ESI-MS解卷积数据显示, 体系中抗体均为原始糖型, 即G0($50448 \pm 2\text{Da}$)、G0F($50595 \pm 2\text{Da}$)、G1F($50756 \pm 2\text{Da}$)和G2F($50918 \pm 2\text{Da}$)糖型; Endo S2 T138Q(图10B)和D184M(图10C)的实验体系中, 主要物质为 m/z 49352 $\pm$ 2 Da、49499 $\pm$ 2 Da, 对应脱糖基后的GlcNAc-单抗1、Fuc α 1,6-GlcNAc-单抗1, 占比大于88%, 而糖型重塑产物GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗1(m/z 49777 $\pm$ 2 Da)对应酸性条件叠氮脱落, m/z 49801 $\pm$ 2 Da对应叠氮未脱落)和Fuc α 1,6-GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗1(m/z 49922 $\pm$ 2 Da对应酸性条件叠氮脱落, m/z 49946 $\pm$ 2 Da对应叠氮未脱落)占比不足12%; 而在本公开的突变体R176Y(图10D)和D179A(图10E)的实验体系中, ESI-MS谱图基本为 m/z 49801 $\pm$ 2 Da、49922 $\pm$ 2 Da和49946 $\pm$ 2 Da物质, 分别对应GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗1(叠氮未脱落)、Fuc α 1,6-GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗1(酸性条件叠氮脱落)、Fuc α 1,6-GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗1(叠氮未脱落)的分子量, 单抗1基本上(大于95%)完成了二糖连接子的偶联且偶联均匀(DAR=2)。

- [0098] 对完整单抗2一步法糖型重塑的结果如图11所示。图11A为不加糖苷内切酶的对照组，单抗2重链的ESI-MS解卷积数据显示，体系中抗体均为原始糖型，即G0($50379 \pm 2\text{Da}$)、G0F($50525 \pm 2\text{Da}$)和G1F($50687 \pm 2\text{Da}$)糖型；Endo S2 T138Q突变体(图11B)和D184M突变体(图11C)试验体系中，脱糖基单抗2，包括GlcNAc-单抗2($m/z\ 49285 \pm 2\text{Da}$)和Fuc α 1,6-GlcNAc-单抗2($m/z\ 49431 \pm 2\text{Da}$)，占比大于84%；而本公开的R176Y突变体(图11D)和D179A突变体(图11E)体系中，超过97%是糖型重塑抗体且偶联均匀(DAR=2)，包括GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗2($m/z\ 49707 \pm 2\text{Da}$ 对应酸性条件叠氮脱落； $m/z\ 49371 \pm 2\text{Da}$ 对应叠氮未脱落)和Fuc α 1,6-GlcNAc-(N3-LacNAc)-单抗2($m/z\ 49852 \pm 2\text{Da}$ 对应酸性条件叠氮脱落； $m/z\ 49877 \pm 2\text{Da}$ 对应叠氮未脱落)。
- [0099] 以上数据表明突变体R176Y、D179A可以在一步法反应中同时完成抗体糖定点偶联的两个步骤——抗体脱糖基化和糖链连接子偶联，并且比目前已知的最佳糖苷合成酶——Endo S2 T138Q突变体和D184M突变体能够更快速地制备具有生物正交反应基团的抗体，减少生产步骤，降低生产成本。
- [0100] 本公开描述了源自血清型M49化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)NZ131菌株的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo S2)的突变体酶，其包括突变位点R176Y和/或D179A，与之前报道的野生型Endo S2及其突变体相比，其在具备增强的转糖基活性同时保留了更多的糖苷水解活性。因此，本公开的突变体酶在抗体糖定点偶联过程如脱糖基化抗体生产和糖链连接子偶联中有着更广泛的应用。
- [0101] 本公开所属技术领域中具有通常知识者应当理解，以上实施例仅用于说明，且在不背离本公开的范畴的情形下，可对突变体蛋白进行各种变更和修饰，包括但不限于N-端和/或C-端的插入和/或截短，蛋白质的糖基化、唾液酸化、白蛋白化、法尼基化、羧化、羟基化、磷酸化和缀合至聚合物的修饰等，重要的是具备Endo S2催化结构域且包含R176和/或D179位的突变。此外，本文描述的实施例中使用了单抗，本公开所属技术领域中具有通常知识者应当理解，相似方法也可以使用到其他糖蛋白或抗体。更此外，本文描述的实施例使用了叠氮修饰的LacNAc二糖连接，本公开所属技术领域中具有通常知识者应当理解，连接

子修饰方法也可以包括但不限于巯基、炔基、醛基修饰，糖链连接子也可以拓展到二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一糖或其他聚糖形式。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种Endo S2突变体酶，其在如下序列：
- (a)SEQ ID NO：1或与SEQ ID NO：1具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列；或
- (b)包含SEQ ID NO：1的第38至819位的连续氨基酸的基础上具有以下1或2个氨基酸位置处的突变：R176和/或D179，并且所述突变体酶具备糖苷水解和/或糖基转移活性。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的Endo S2突变体酶，所述突变选自如下的至少一种：R176Y、D179A。
- [权利要求 3] 一种多核苷酸，其编码权利要求1或2中所述的Endo S2突变体酶。
- [权利要求 4] 一种载体，其包含权利要求3所述的多核苷酸。
- [权利要求 5] 一种宿主细胞，其用权利要求4所述的载体转化。
- [权利要求 6] 如权利要求1或2所述的Endo S2突变体酶在含有N-聚糖的多肽或蛋白质的糖基改造中的用途。
- [权利要求 7] 如权利要求6所述的用途，其用于重塑抗体的糖型，或用于糖蛋白的糖链重构，或用于制备包含抗体的检测药物或ADC药物中的用途。
- [权利要求 8] 一种利用一步法对含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖链重塑的方法，包括以下步骤：
- (a)引入权利要求1或2所述的Endo S2突变体酶；
- (b)引入含有N-聚糖的多肽或蛋白质作为底物；
- (c)提供糖链连接子供体；和
- (d)利用所述的Endo S2突变体酶将含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖苷水解并将糖链连接子供体转移至糖苷水解产物上，以提供糖链改造的新多肽或蛋白质；
- 所述一步法不含有对糖苷水解产物的纯化步骤。
- [权利要求 9] 一种利用两步法对含有N-聚糖的多肽或蛋白质进行糖链重塑的方法，其引入两次酶，分别进行糖苷水解和转新糖基，其中，权利要

求1或2所述的Endo S2突变体酶至少在糖苷水解或转新糖基的一个步骤中使用，所述方法包括以下步骤：

(a)引入权利要求1或2所述的Endo S2突变体酶或其他适用的内切糖苷水解酶；

(b)引入含有N-聚糖的多肽或蛋白质作为底物，在(a)步骤的酶作用下进行糖苷水解，从而提供糖苷水解产物作为下一步转新糖基的受体；

(c)提供糖链连接子供体；和

(d)通过所述的Endo S2突变体酶或其他适用的糖基转移酶将糖链连接子供体转移至受体上以生成糖链改造的新多肽或蛋白质；

任选地，在(b)和(c)步骤之间还含有对糖苷水解产物的纯化步骤。

[权利要求 10] 如权利要求8或9所述的方法，所述含有N-聚糖的多肽或蛋白质包括天然存在的抗体、重组抗体、抗体的Fc片段或唾液酸糖肽。

[权利要求 11] 如权利要求8或9所述的方法，其中所述糖链连接子供体是合成聚糖噁唑啉或天然N-聚糖噁唑啉。

[权利要求 12] 如权利要求11所述的方法，其中所述天然N-聚糖噁唑啉包含复杂型聚糖噁唑啉、高甘露糖聚糖噁唑啉、或杂合噁唑啉。

[权利要求 13] 如权利要求11所述的方法，其中所述合成聚糖噁唑啉是二糖噁唑啉、三糖噁唑啉、四糖噁唑啉、五糖噁唑啉、六糖噁唑啉、七糖噁唑啉、八糖噁唑啉、九糖噁唑啉、十糖噁唑啉或十一糖噁唑啉。

[权利要求 14] 如权利要求8或9所述的方法，其中所述糖链连接子供体还包含另外的修饰方法或另外的标签。

[权利要求 15] 如权利要求14所述的方法，其中所述另外的修饰方法选自叠氮化、醛基化、炔基化、巯基化、羟基化、羧化、磷酸化、唾液酸化、白蛋白化、法尼基化或缀合至聚合物的修饰。

[权利要求 16] 如权利要求14所述的方法，其中另外的标签选自治疗性药物、毒素物质、荧光探针、生物素、脂质、抗原片段、PEG、RNA、D

NA、多肽、蛋白质、酶、酶底物、酶抑制剂、酶调节剂或抗体片段。

[权利要求 17] 一种糖链重塑的抗体及其ADC药物，其利用如权利要求8-16所述的方法制备。