蛋白质氮连接聚糖的化学合成研究进展

杨冰, 贺长栋, 董魁伟*

北京大学药学院化学生物学系, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

* 通讯作者, E-mail: dongs@hsc.pku.edu.cn

收稿日期: 2018-04-04; 接受日期: 2018-05-11; 网络版发表日期: 2018-07-09

国家“千人计划”青年项目、北京大学医学部和天然药物及仿生药物国家重点实验室项目资助

摘要 糖是自然界种类最丰富、结构最多样的一类生物分子, 参与了许多重要的生命过程. 糖在生物体内通常以糖脂、糖蛋白等缀合物的形式存在, 发挥着十分重要的生物学作用. 氮连接聚糖(*N*-linked glycan)是糖蛋白的重要组成部分, 但是在自然界中通常以微观非均一的形式存在, 均一结构的糖链难以获取, 这极大地阻碍了糖科学的相关研究. 化学合成是获取均一结构聚糖、进而用以研究其生物学功能的重要手段. 本综述着重总结了通过化学方法制备真核蛋白质中最为常见的一类糖链——复杂型氮连接聚糖的最新研究进展.

关键词 糖, 氮连接聚糖, 复杂型*N*糖链, 糖蛋白, 化学合成

1 引言

糖、核酸、蛋白质和脂质是细胞的主要成分, 在生命过程中发挥着不可替代的作用^[1]. 在这四类重要的生物分子中, 糖具有种类丰富、结构多样的特点, 在细胞表面和细胞外基质中, 主要以寡糖、多糖或糖蛋白、糖脂和其他糖缀合物的形式存在^[2]. 糖以及糖缀合物具有重要的生物学功能, 尤其是糖蛋白类分子, 参与或介导了包括细胞黏附、信号转导、肿瘤转移、宿主-病原体相互作用和免疫反应等许多生物过程^[3,4]. 研究表明, 50%以上的真核细胞蛋白质具有糖基化修饰^[5], 尤其在细胞表面的蛋白质中, 超过70%含有糖链结构. 作为最普遍的蛋白质翻译后修饰之一, 糖链在蛋白质的折叠、运输、免疫响应以及蛋白质的功能等方面发挥着重要作用^[6].

基于聚糖与蛋白质多肽链共价结合的不同连接方

式, 糖蛋白上的糖链主要分为两类, 氧连接(*O*-linked)型和氮连接(*N*-linked)型. 前者大多通过单糖-*N*-乙酰- α -*D*-半乳糖胺(GalNAc)与丝氨酸或苏氨酸的羟基连接; 后者则通常以-*N*-乙酰- α -*D*-半乳糖胺(GlcNAc)与特定序列Asn-Xaa-Ser/Thr中的天冬酰胺残基侧链连接^[7]. 从结构上看, 氮连接聚糖(*N*-linked glycan)普遍具有共同的核心五糖 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, 并在此基础上根据远端位置糖型的差异可进一步衍生出3个亚型(图1): 高甘露糖型(high-mannose type)、杂化型(hybrid type)和复杂型(complex type). 每种类型可包含两个或两个以上的分支(antenna), 每个分支可能含有数目不等的单糖, 这些特点进一步增加了氮连接聚糖结构的复杂性^[8]. 在生物体中, 糖链的合成不会受到基因模板的调控, 而是由不同的糖基转移酶催化连接不同的单糖而成, 这种非中心法则指导的合成直接导致蛋白质所连接的聚糖具有微观不均一性, 即在同种蛋白质中糖基化位点

引用格式: Yang B, He C, Dong S. Recent advances in chemical synthesis of protein *N*-linked glycans. *Sci Sin Chem*, 2018, 48: 1321–1331, doi: [10.1360/N032018-00082](https://doi.org/10.1360/N032018-00082)

图1 氮连接型聚糖的亚型(网络版彩图)

Figure 1 Subtypes of *N*-linked glycans (color online).

可能存在差异, 且在同一糖基化位点也可能被不同的糖链结构所修饰^[1]. 不同的聚糖结构修饰影响糖蛋白的生物功能, 如具有不同分支、含有或不含唾液酸的复杂型糖链修饰的 β -干扰素具有不同程度的抗癌活性^[9], 多分支复杂型糖链对于维持糖蛋白促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)空间结构的稳定性发挥重要作用, 且唾液酸 N -糖链的数目直接影响其体内生物活性^[10,11], 再如肝分泌糖蛋白(liver-secreted glycoproteins)的岩藻糖基化与肝癌的发生、发展密切相关^[12].

由于氮连接聚糖巨大的结构多样性和复杂性, 研究氮连接聚糖在各种生物过程中的分子基础和生物功能面临极大的困难和挑战^[5], 也对发展更加有效的工具和方法提出了更高的要求. 目前获取均一结构氮连接聚糖的方法主要有天然来源提取纯化、化学酶法和化学合成等^[13-15]. 其中化学合成的方法具有产物纯度高、精确性和灵活性好、易于结构改造和衍生化、较易于规模化制备等优点. 但是糖链结构的复杂性使得以其为目标的合成极具挑战性, 通常需要经过较为繁琐的合成步骤, 需要合理选择保护基操作和糖基化方法实现区域和立体选择性控制^[13,16], 从而得到均一结构糖分子. 在过去的几十年中, 糖化学家们致力于发展更为高效的糖链合成方法和策略, 使得化学合成糖^[17]和糖缀合物分子^[18,19]取得了令人瞩目的进展, 这些工作也已经得到了较好的总结和综述^[20-23]. 本文将着重对近年来针对真核细胞蛋白质 N -糖链的化学合成实例进行总结, 重点介绍合成中所采用的组装策略. 限于篇幅, 对糖苷键形成的具体反应细节, 以及天然来源提取纯化和化学酶法获取氮连接聚糖等方面的内容, 将不再赘述.

2 基于核心五糖的氮连接聚糖组装

糖链结构的极端复杂性, 尤其是合成中需要控制区域选择性和立体选择性, 使得相应的化学合成没有完全通用的方法和策略. 然而基于氮连接聚糖中普遍存在五糖核心结构, 制备该类糖链的策略常常是以核心五糖作为关键中间体, 并且多采用常规的液相合成方法.

近期在合成氮连接聚糖方面, Danishefsky课题组^[27]做了较多的探索工作. 他们借鉴之前报道的合成路线^[24-26], 利用三氟甲磺酸酐介导的直接 β -甘露糖基化方法构建了核心五糖中关键的 β -甘露糖基壳二糖结构, 再经过双 α -甘露糖基化完成核心五糖的合成(图2). 图3总结了这一改良合成路线的关键反应步骤. 二糖烯1的还原端官能团化得到糖基受体2, 之后利用供体3进行Crich甘露糖基化, 得到三糖4并进一步将其转化为二醇5. 在Sinay自由基阳离子活化条件下^[28]使用过量的硫代甘露糖6对5进行双重糖基化, 以良好的产率和立体选择性得到核心五糖7. 从关键中间体4还可以制备具有差异化裸露羟基位点的五糖受体8, 9, 10, 分别

图2 核心五糖的合成策略

Figure 2 Synthetic strategy toward the core pentasaccharides.

图 3 Danishefsky课题组改进的核心五糖合成路线

Figure 3 Synthetic route to the core pentasaccharide from the Danishefsky group.

图 4 二、三、四分枝N-乙酰乳糖胺型氮连接聚糖的合成(网络版彩图)

Figure 4 Synthesis of bi-, tri- and tetra-antennary *N*-acetylglucosamine-type *N*-linked glycans (color online).

进一步与糖基供体**11**反应后可以获得前列腺特异性膜抗原聚糖(prostate-specific membrane antigen, PSMA), 二、三、四分支的*N*-乙酰乳糖胺型氮连接聚糖**12**, **13**, **14** (图4)^[29]

基于以上合成工作, Danishefsky课题组^[30,31]进一步建立了针对唾液酸化氮连接聚糖的合成方法, 运用邻苯二甲酰基代替之前研究中的苯磺酰基来保护糖胺, 并且发现使用2,5-二氟苯甲酰基(dFBz)保护基能够有效提高脱保护步骤的产率. 这项合成工作的关键步骤如图5所示: 首先根据前述策略合成具有两个或3个

裸露羟基的核心五糖受体**17**与**21**，随后利用唾液酸化氟代三糖**18**进行糖基化修饰，以高产率获得目标的二分支十一糖**19**和三分支十四糖**22**。该策略中，核心五糖一步连接多达3个分支糖的方法非常高效，可以作为制备非岩藻糖基化复杂型氮连接聚糖的一个通用合成方案。脱保护的十四糖及其岩藻糖基化类似物广泛存在于包括促红细胞生成素、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)在内的糖蛋白组中。

除了在液相合成方法上发展新的糖基化方法和组

图 5 完全唾液酸化的二、三支复杂型氮连接聚糖的合成(网络版彩图)

Figure 5 Synthesis of fully sialylated bi- and tri-antennary complex-type *N*-linked glycans (color online).

图 6 自动固相合成核心五糖

Figure 6 Automated solid-phase synthesis of core pentasaccharide.

图 7 促红细胞生成素岩藻糖基化十二糖的合成(网络版彩图)

Figure 7 Synthesis of fucosylated dodecasaccharide of EPO (color online).

装策略外, 糖化学家们还进行了许多探索, 例如, 借助固相合成策略极大地减少纯化步骤, 进而大幅提高糖链合成效率。例如, Seeberger课题组^[32]在2003年报道了使用自动糖合成仪组装核心五糖, 从辛二醇修饰的Merrifield树脂**23**开始, 利用预先合成好的糖砌块**24**, **26**, 和**28**, 通过5个程序化模块在376.6 min内即可完成与树脂相连的全保护五糖**29**的合成(图6)。这种自动化合成的方法有望解决部分类型寡糖快速获取的难题。

3 基于岩藻糖基化合成氮连接聚糖

自从科学家们发现在部分天然氮连接聚糖中含有岩藻糖基衍生化, 许多课题组开始以复杂型岩藻糖基化十二糖或其取代的糖蛋白作为合成研究对象, 如促红细胞生成素^[33,34]和促卵泡激素^[35]等。相应的合成策略与前述合成非岩藻糖基化的N-糖链类似, 首先构建

岩藻糖基化的核心六糖(图7): 糖烯**31**与氟代岩藻糖基供体**32**反应得到三糖**33**, 在进一步通过与供体**3**和**6**偶联获得六糖**34**。另一方面, 对二糖**36**进行唾液酸化修饰制得三糖供体**37**^[36], 其在Sinay自由基阳离子活化条件下与**34**发生糖苷化反应组装出全保护的十二糖**38**, 经几步脱保护操作后得到岩藻糖基化十二糖**39**。该唾液酸化聚糖后续被进一步应用于糖蛋白促红细胞生成素的化学合成中^[37-39]。

除了Danishefsky小组的工作以外, 黄雪飞课题组^[40]在2008年报道了基于预活化的一釜合成策略对岩藻糖基化复杂型十二糖的全合成工作。该研究通过预活化唾液酸二糖**40**实现与硫苷受体**41**的选择性糖基化反应得到三糖**42**, 不经分离和后处理, 在同一反应釜中进一步活化**42**, 使之与被活化并与后加入的六糖受体**43**反应, 高效实现了岩藻糖基化十二糖**44**的组装(图8)。这个例子充分展示了基于预活化的一釜合成策略在快

图8 基于预活化的一锅法策略合成岩藻糖基化十二糖(网络版彩图)

Figure 8 Synthesis of fucosylated dodecasaccharide via pre-activation-based one-pot strategy (color online).

速组装复杂型唾液酸化氮连接聚糖中的高效性。

2009年, Danishefsky课题组^[41]通过化学合成得到存在于免疫球蛋白G (immunoglobulin, IgG)上具有代表性的均一结构岩藻糖基化十三糖。与之前合成的十二糖相比, 该型氮连接聚糖除了含有两个 α -2,6连接的末端唾液酸之外, 还有一个通过 β 糖苷键与中心甘露糖C4氧相连的氮乙酰葡萄糖胺。主要的糖合成和组装策略如图9所示: 首先 β 甘露糖基化的壳二糖45和磺酰胺保护的糖基供体46反应构成四糖骨架47, 其中磺酰胺官能团对于后续引入两个 α 甘露糖苷和一个岩藻糖苷的糖基化反应至关重要。得到核心七糖结构49后, 与氟代糖基供体50偶联衍生甘露糖单元得到九糖51, 再与二糖供体52进行双糖基化反应即得到全保护十三糖

53。经过进一步脱保护步骤, 以及与多肽片断的缀合, 最终完成了均一结构的IgG糖肽片段54的全合成。这项工作的亮点在于利用化学方法实现了在同一甘露糖单元的3, 4, 6位引入三个糖苷, 为实现三分支、四分支氮连接聚糖的合成打下重要基础。

4 通过汇聚组装策略合成氮连接聚糖

除了优化糖基化反应以外, 提高复杂型氮连接聚糖的整体合成效率, 还要求在组装策略上采用更加汇聚式的方案。一个具有代表性的合成案例是Unverzagt课题组^[42]通过优化汇聚路线高效合成氮连接聚糖。通过设计合成5个模块单元, 包括三糖55以及Schmidt供

图9 免疫球蛋白G岩藻糖基化十三糖的合成(网络版彩图)

Figure 9 Synthesis of fucosylated tridecasaccharide appended on immunoglobulin G (color online).

体**56**, **58**, **60**, **64**, 以及对这些模块的拼装, 可以快速合成得到三支寡糖**59**, 四分支寡糖**62**, **63**和五分支寡糖**65** (图10)^[43]. 五分支寡糖存在于卵类黏蛋白(ovomu-

coid)、以及中国仓鼠卵巢细胞(CHO cells)和HepG2细胞(liver hepatocellular cells)等所含蛋白质表面.

采用类似的汇聚组装策略, 翁启惠课题组^[44]也实

图 10 利用Schmidt供体合成多分支复杂型氮连接聚糖(网络版彩图)

Figure 10 Synthesis of multi-antennary N-linked glycans using Schmidt donors (color online).

图 11 利用氟代糖基供体合成的多分支复杂型氮连接聚糖

Figure 11 Synthesis of multi-antennary *N*-linked glycans using glycosyl fluoride donors.

现了HIV-1包膜糖蛋白gp 120上二分支、三分支和四分支复杂型氮连接聚糖高效合成, 其中氟代糖基供体 66, 67, 68分别组装到三糖69上得到聚糖70, 71和72 (图11).

5 结论

本综述简要总结了近年来对存在于真核生物糖蛋白上最具代表性的复杂型氮连接聚糖的化学合成工作

和最新进展. 从这些典型案例里可以看到, 为了解决均一结构聚糖的可获得性问题, 糖化学家们一直致力于开发更为有效的合成方法和策略, 包括基于预活化的一釜合成、固相寡糖合成等都取得了令人瞩目的进展. 然而, 聚糖结构的复杂性和多样性, 使得糖链的化

学和生物学研究仍然充满着挑战. 为了满足糖生物学研究以及药物研发中对均一结构糖链的迫切需求, 仍然需要继续提高糖合成的效率, 这也期待着糖化学家们发挥创造力, 提出更巧妙的设计和更具创新性的策略.

参考文献

- 1 Krasnova L, Wong CH. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 599–630
- 2 Wang LX, Davis BG. *Chem Sci*, 2013, 4: 3381–3394
- 3 Marth JD, Grewal PK. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 874–887
- 4 Helenius A, Aebi M. *Science*, 2001, 291: 2364–2369
- 5 Wong CH. *J Org Chem*, 2005, 70: 4219–4225
- 6 Wu CY, Wong CH. *Chem Commun*, 2011, 47: 6201
- 7 Kajihara Y, Izumi M, Hirano K, Murase T, Macmillan D, Okamoto R. *Isr J Chem*, 2011, 51: 917–929
- 8 Durand G, Seta N. *Clin Chem*, 2000, 46: 795–805
- 9 Kajihara Y. *Bull Chem Soc Jpn*, 2016, 89: 409–423
- 10 Egrie JC, Browne JK. *Br J Cancer*, 2001, 84: 3–10
- 11 Murakami M, Kiuchi T, Nishihara M, Tezuka K, Okamoto R, Izumi M, Kajihara Y. *Sci Adv*, 2016, 2: e1500678
- 12 Pompach P, Ashline DJ, Brnakova Z, Benicky J, Sanda M, Goldman R. *J Proteome Res*, 2014, 13: 5561–5569
- 13 Wang LX, Amin MN. *Chem Biol*, 2014, 21: 51–66
- 14 Wang Z, Chinoy ZS, Ambre SG, Peng W, McBride R, de Vries RP, Glushka J, Paulson JC, Boons GJ. *Science*, 2013, 341: 379–383
- 15 Li L, Liu Y, Ma C, Qu J, Calderon AD, Wu B, Wei N, Wang X, Guo Y, Xiao Z, Song J, Sugiarto G, Li Y, Yu H, Chen X, Wang PG. *Chem Sci*, 2015, 6: 5652–5661
- 16 Boltje TJ, Buskas T, Boons GJ. *Nat Chem*, 2009, 1: 611–622
- 17 Wu Y, Xiong DC, Chen SC, Wang YS, Ye XS. *Nat Commun*, 2017, 8: 14851
- 18 Tanaka H, Nishiura Y, Takahashi T. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 17244–17245
- 19 Shimawaki K, Fujisawa Y, Sato F, Fujitani N, Kuroguchi M, Hoshi H, Hinou H, Nishimura SI. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 3074–3079
- 20 Zhu X, Schmidt RR. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 1900–1934
- 21 Seeberger PH. *Acc Chem Res*, 2015, 48: 1450–1463
- 22 Yasomanee JP, Demchenko AV. *TIGG*, 2013, 25: 13–42
- 23 Hsu CH, Hung SC, Wu CY, Wong CH. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 11872–11923
- 24 Crich D, Sun S. *J Org Chem*, 1997, 62: 1198–1199
- 25 Crich D, Sun S. *Tetrahedron*, 1998, 54: 8321–8348
- 26 Crich D, Dudkin V. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 6819–6825
- 27 Dudkin VY, Miller JS, Danishefsky SJ. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44: 1791–1793
- 28 Zhang YM, Mallet JM, Sinaÿ P. *Carbohydr Res*, 1992, 236: 73–88
- 29 Dudkin VY, Miller JS, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 736–738
- 30 Walczak MA, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 16430–16433
- 31 Walczak MA, Hayashida J, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 4700–4703
- 32 Ratner DM, Swanson ER, Seeberger PH. *Org Lett*, 2003, 5: 4717–4720
- 33 Lomino JV, Naegeli A, Orwenyo J, Amin MN, Aebi M, Wang LX. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 2262–2270
- 34 Wu B, Hua Z, Warren JD, Ranganathan K, Wan Q, Chen G, Tan Z, Chen J, Endo A, Danishefsky SJ. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47: 5577–5579
- 35 Nagorny P, Fasching B, Li X, Chen G, Aussedat B, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5792–5799
- 36 Bhattacharya SK, Danishefsky SJ. *J Org Chem*, 2000, 65: 144–151

- 37 Yuan Y, Chen J, Wan Q, Tan Z, Chen G, Kan C, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5432–5437
- 38 Tan Z, Shang S, Halkina T, Yuan Y, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5424–5431
- 39 Kan C, Trzupek JD, Wu B, Wan Q, Chen G, Tan Z, Yuan Y, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5438–5443
- 40 Sun B, Srinivasan B, Huang X. *Chem Eur J*, 2008, 14: 7072–7081
- 41 Wang P, Zhu J, Yuan Y, Danishefsky SJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 16669–16671
- 42 Unverzagt C. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1997, 36: 1989–1992
- 43 Eller S, Schuberth R, Gundel G, Seifert J, Unverzagt C. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 4173–4175
- 44 Shivatare SS, Chang SH, Tsai TI, Ren CT, Chuang HY, Hsu L, Lin CW, Li ST, Wu CY, Wong CH. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 15382–15391

Recent advances in chemical synthesis of protein *N*-linked glycans

Bing Yang, Changdong He, Suwei Dong*

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

*Corresponding authors (email: dongs@hsc.pku.edu.cn)

Abstract: Carbohydrates are the most abundant and structurally diverse class of biomolecules, which were involved in various biological processes. Carbohydrates play crucial roles in biological systems, and mostly exist in the forms of glycoproteins, glycolipids, and other glycoconjugates. *N*-linked glycans are essential components of glycoproteins, but are difficult to be obtained in homogeneous forms from natural sources, creating formidable challenges to the research in related fields such as glycobiology. Chemical synthesis represents an important approach for preparing homogeneous carbohydrates, which greatly benefits the study of glycan functions. In this review, we highlight recent advances in the chemical synthesis of complex-type *N*-glycans that frequently present on eukaryotic proteins with essential biological functions.

Keywords: carbohydrates, *N*-linked glycans, complex-type glycans, glycoproteins, chemical synthesis

doi: [10.1360/N032018-00082](https://doi.org/10.1360/N032018-00082)