

糖蛋白药物表达系统糖基化研究进展

徐沙^{1,2}, 中西秀树^{1,2}, 高晓冬^{1,2*}

江南大学,¹生物工程学院糖生物学与生物技术教育部重点实验室,²食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 随着基因重组技术的不断发展和蛋白糖基化机制研究的不断深入, 糖蛋白药物对人类健康的重要作用越来越受到重视。迄今为止, 哺乳动物表达载体仍然是最常见的药用蛋白生产系统。由于其存在成本高、产率低等问题, 酵母和细菌表达系统也日益受到重视。受到理论和技术的限制, 细菌表达系统的开发仍存在相当大的困难, 而酵母表达系统的开发和应用已经取得了一系列突破性的成果。本文综述了国内外近年来改造不同表达系统 N-糖基化途径用于生产人源糖蛋白的研究进展。

关键词: 医药糖蛋白, 蛋白糖基化, 人源化, 基因工程

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0221-09

糖蛋白 (Glycoproteins) 是由糖类分子与蛋白质分子通过共价结合形式形成的一类蛋白质。糖基化修饰使得蛋白质的性质和功能呈现出更为丰富的多样性。真核生物的分泌型蛋白和质膜外表面蛋白多为糖蛋白。近 30 年来, 随着基因重组技术的发展和蛋白糖基化机制研究的不断深入, 糖蛋白药物对人类健康的重要作用越来越受到重视。目前获得广泛应用的医药蛋白中, 70% 以上是糖蛋白^[1]。已有多种糖蛋白被批准用于治疗人类疾病, 包括促红细胞生成素、血液凝结因子、癌症诊断标记物, 以及多种干扰素和单克隆抗体等。

由于特殊的理化性质和药理特性, 蛋白药物经常出现治疗效果欠佳的情况。通过蛋白糖基化工程对蛋白表面的糖链进行改造, 可以改善蛋白药物在体内的分子稳定性、药效反应和药代动力学性质等, 具有广阔的应用前景。糖基化对某一个特定蛋白的主要影响包括: (1) 改变蛋白质的生物活性^[2]; (2)

防止蛋白质聚集, 增加蛋白质的稳定性, 从而延长蛋白质药物的半衰期; (3) 特定的糖链结构可参与某些特定的免疫反应^[3], 参与分子间的相互识别^[4-5], 甚至可以增强药物的靶向性^[6]。因此, 糖链结构对糖蛋白药物的化学性质、生理活性及免疫原性至关重要。

蛋白糖基化修饰一共有 5 种类型, 按重要性排序分别是 N-、O-、P-、C- 和 G- 糖基化^[7]。这些糖基化修饰均通过连接寡糖基团到蛋白表面, 但其修饰位点不同。其中以 N-糖基化最为普遍, 其通过将聚糖连接到天冬氨酸或精氨酸侧链的氮原子上对蛋白进行修饰, 是目前研究的最为透彻的糖基化过程。本文所提及的糖基化都是指 N-糖基化。

一直以来, 大部分药物糖蛋白依赖于直接从生物体中提取, 但因为数量有限、成本高昂、存在病毒感染等问题, 无法广泛运用于临床。因此, 目前的研究主要集中在开发糖蛋白表达载体, 经过适当的糖

基金项目: 教育部科学技术研究重大项目 (313027); 江南大学自主科研项目基金 (JUSRP211A25); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题 (KL1B-KF201106)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197003; E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

作者简介: 徐沙 (1984-), 女, 江苏无锡人, 副教授, 主要从事糖生物学和分子生物学的研究。E-mail: xusha1984@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-09-12; **修回日期:** 2013-01-08

基化改造,用于药用蛋白质的生产。本文在综述国内外各种表达系统研究动态的基础上重点阐述酵母表达系统的研究进展。

1 糖蛋白表达系统

目前应用于临床的生物制药数量稳步增长。迄今为止,已有超过 150 个重组蛋白通过 FDA 和欧洲药品管理局(EMEA)的许可作为药品使用。全球生物制药市场估计价值约 500 - 600 亿欧元。此外,这

个市场在未来几年,预计每年以约 9% 的速度增长。

在理想条件下,运用于生产重组医药蛋白的表达系统必须符合以下几个条件:(1) 可以在廉价培养基上迅速生长;(2) 便于基因操作;(3) 能够进行复杂的糖基化反应和形成二硫键;(4) 下游提取操作方便且成本较低等。高等真核生物表达系统的糖基化形式最接近人类,但基因操作困难,生产成本高、产率低。与之相较,细菌和酵母表达系统更适合于大规模的工业生产,但二者形成的糖链结构与人类有不同程度的区别,是基因工程技术改造的重点(表 1)。

表 1 利用不同表达系统生产医药糖蛋白比较^[7]

Table 1 Comparison of pharmaceutical glycoprotein production by different expression systems^[7]

Features	Bacteria	Yeasts	Higher eukaryotes
Relevant species	<i>E. coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia pastoris</i>	Chinese hamster ovary cells (CHO) human embryonic kidney cells (HEK)
Genetic manipulation	Very easy	Easy	difficult
Substrate cost	Low	Low	High
Productivity	Very high	High	Low
Secretion	Into periplasm (Gram-negative bacteria) culture medium (Gram-positive bacteria)	Into culture medium	Into culture medium
Glycosylation	Rarely occurs	Hypermannosylated	Humanlike glycosylation
Protein folding	Often refolding necessary	Refolding sometimes	No folding problems
Potential virus	Low	Low	Rather high

1.1 高等真核表达系统

1986 年,人体组织纤维蛋白溶酶原激活剂(TPA)成为第一个获得上市许可的由哺乳动物细胞的生产的重组医药蛋白^[8]。迄今为止,约有 60 - 70% 的重组蛋白药物在哺乳动物细胞中生产。中国仓鼠卵巢细胞(CHO)是现今最为常用的哺乳动物细胞株,其他细胞株,如人类胚胎肾细胞(HEK)^[9]、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠骨髓瘤细胞(NS0)和人视网膜细胞(PERC. 6)^[8, 10]等都在进一步研究

和开发中。

与低等真核生物和细菌表达系统相比,哺乳动物细胞株的主要优势在于其重组蛋白的糖基化形式与人类相似。哺乳动物的 N-聚糖以复合型和杂合型为主(图 1-A、B),而酵母则为高甘露糖基化(图 1-C)。不同的哺乳动物细胞株之间其糖基化形式也不完全相同。例如,人体细胞一般不表达 α -1,3 半乳糖基转移酶(α -1,3-GalT),因此会对被 α -1,3-半乳糖修饰的糖链起免疫反应。许多小鼠细胞表达

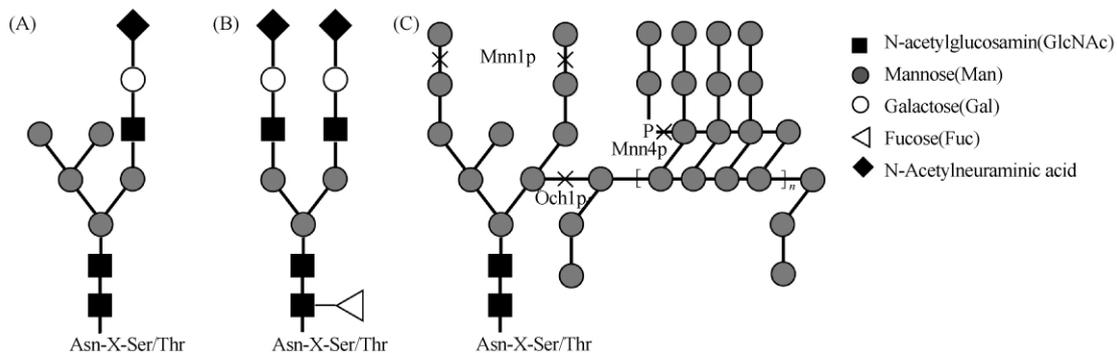


图 1 糖蛋白的不同糖基化形式

Fig. 1 Different glycosylated forms of glycoproteins. A: Hybrid type, B: Complex type, C: Heavy mannose type.

系统,包括杂交瘤细胞生产的人源化抗体都含有 α -1,3-半乳糖。另外有研究表明,pH、溶氧浓度(DO)、温度、代谢副产物和细胞培养方式等外环境也会影响蛋白的糖基化形式^[11]。

尽管多数重组医药糖蛋白通过哺乳动物细胞生产,但是基因操作复杂、外源基因不能精确定位、生产成本高、产率低等问题极大地限制了哺乳动物表达系统的发展和应用。此外,有研究表明由于不能完整的糖基化,CHO细胞生产的促红细胞生成素有80%都被浪费了^[12]。因此,利用基因表达分析技术和系统生物学理论对动物细胞蛋白糖基化过程和基因表达、细胞生长等进行理性调控是提高哺乳动物细胞生产能力的关键。

1.2 原核表达系统

最初人们认为糖基化过程只在真核生物中发生,随着研究的深入,越来越多的糖基化蛋白在原核生物中发现,表明蛋白的糖基化修饰也普遍存在于原核生物中。最早发现的原核生物糖蛋白是古细菌中的糖基化S层(surface layer)蛋白(图2-A)^[13]。

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)是最早发现N-糖基化途径的细菌^[14],与蛋白糖基化相关的基因座 pgl 约17 kb,其糖基化的过程起始于稀有氨基酸Bacillosamine(Bac)的合成(图2-B)。随后,PglC将Bac残基连接到脂载体UndPP上,其余的糖

基在内膜的胞质侧由4种糖基转移酶(PglA、PglH、PglJ和PglI)以活化的核苷酸糖为底物顺序添加。整个七聚糖结构由ABC(ATP binding cassette,ATP结合盒)转运蛋白PglK将糖链穿过内膜翻转到周质空间。寡糖转移酶(Oligosaccharide transferase,OST)PglB在周质将寡糖转移到目标肽链上,其功能与古细菌中的AgIB和真核生物中的OST复合体类似。PglB对糖基化位点氨基酸保守序列的特异性比古细菌和真核生物更为严格,保守序列从真核生物的Asn-X-Ser/Thr扩大到Asp/Glu-Y-Asn-X-Ser/Thr,而研究发现Asp-Gln-Asn-Ala-Thr是PglB的最佳识别序列^[15]。真核生物的寡糖转移酶只能糖基化未折叠的蛋白,而空肠弯曲杆菌的PglB能够使完全折叠的蛋白糖基化^[16]。

在模式菌大肠杆菌中的表达空肠弯曲杆菌Pgl基因座,首次展现了利用大肠杆菌生产重组糖蛋白和进行细菌糖基化工程研究的可能性。Abei等通过在大肠杆菌中敲除O抗原连接酶(WaaL),表达空肠弯曲杆菌的N-糖基化途径和寡糖转移酶PglB,成功的将O多糖转移到目的蛋白上^[17]。Jagroop等利用来源于空肠弯曲杆菌的AcrA作为模式蛋白,在经过糖基化途径重组的大肠杆菌中进行表达,结果发现该蛋白可以被糖基化,但效率仅为13%,而过量表达异柠檬酸裂解酶可以使AcrA糖基化的效

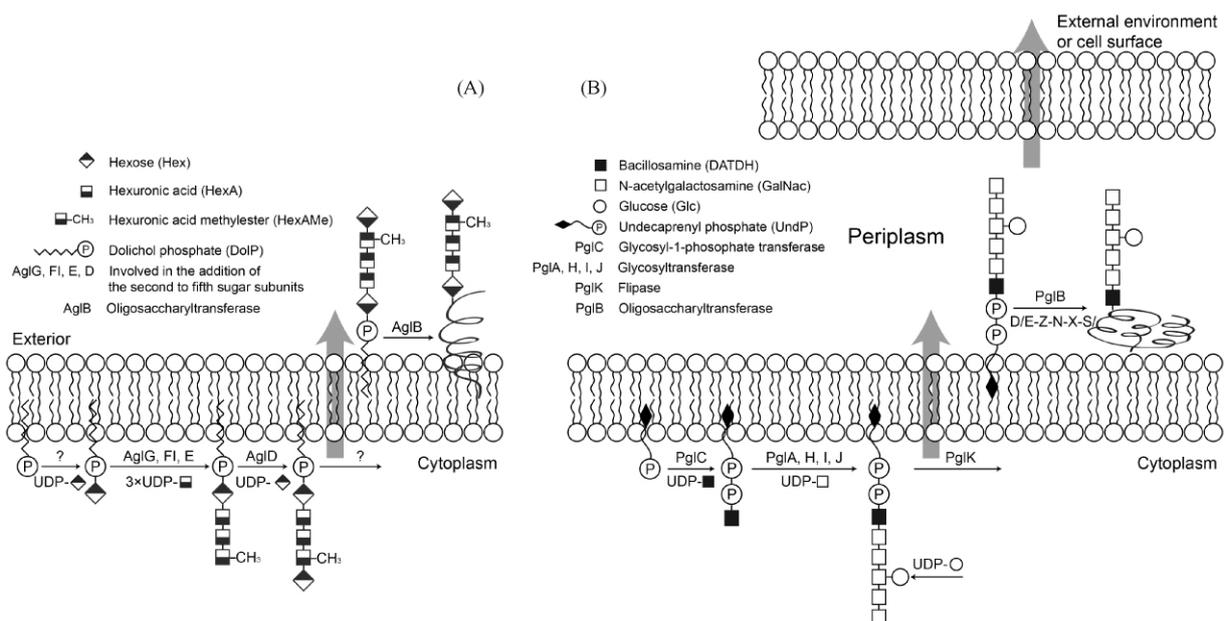


图2 古细菌和原核生物的N-糖基化途径

Fig.2 N-linked glycosylation in archaea and prokaryotes.

率提高近 3 倍^[18]。另外, Kowarik 等发现, PglB 在体外还可以对真核细胞蛋白质核糖核酸酶 A 和霍乱毒素进行糖基化, 但必须进行适当的改造, 将它们的糖基化位点改造成原核生物的识别序列^[16], 并使其糖基化肽段处于一个相对柔性的区域^[19]。在后续的研究中, Schwarz 等^[20] 成功的利用大肠杆菌表达系统对人类抗体片段 F8 和 CH2 进行糖基化。最近, Abei 等继续在大肠杆菌中表达真核生物 N-糖基化途径, 得到糖链结构为 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 的大肠杆菌麦芽糖结合蛋白^[21]。这些研究成果为进一步利用大肠杆菌生产人源化的糖蛋白提供理论依据和技术基础。

就目前而言, 原核生物表达系统局限于开发细菌来源的糖蛋白, 利用大肠杆菌作为表达系统开发人源化的糖蛋白有两个关键问题有待解决: (1) PglB 对肽链糖基化位点的识别比真核生物更为严格, 如果不对其进行改造, 可能无法将特定的糖链转移到人源目的蛋白上; (2) 与真核生物蛋白的翻译中修饰不同, 大肠杆菌蛋白是折叠后修饰, 因此修饰位点主要集中在蛋白的表面, 可能无法满足部分人体蛋白的糖基化要求。

1.3 低等真核表达系统

与其它表达系统相比, 酵母表达系统具有以下优势: (1) 外源蛋白基因遗传稳定; (2) 具有真核细胞翻译后加工、合成具有生物活性重组糖蛋白所必需的亚细胞器结构和相关基因; (3) 生长快、表达水平高, 既可在胞内表达、又可实现分泌型表达; (4) 发酵工艺成熟, 易于放大; (5) 培养成本低, 产物易分离。但是, 典型的酿酒酵母、毕赤酵母以及常见的假丝酵母等, 和人的糖基化过程还存在一定差异。酵母的糖基化系统是高甘露糖基化 (Antigenic hypermannosylated) 的, 而人体细胞不存在高甘露糖修饰 (图 1)。酵母中产生的高甘露糖基化, 一方面可能导致糖蛋白活性和反应动力学的变化, 另一方面可能导致人体的过敏反应。因此, 必须通过适当的基因工程、代谢工程操作, 改造酵母自身的翻译后修饰过程, 使其适应大部分医药用糖蛋白的生产要求^[22]。

1.3.1 N-糖基化过程的研究和糖基转移酶的鉴定: 酵母 N-聚糖的生物合成过程在 20 世纪的 60 年代和 70 年代被阐明。N-糖基化的第一步是组装一个与多萜醇脂连接的寡糖前体。其中, 多萜醇寡糖前

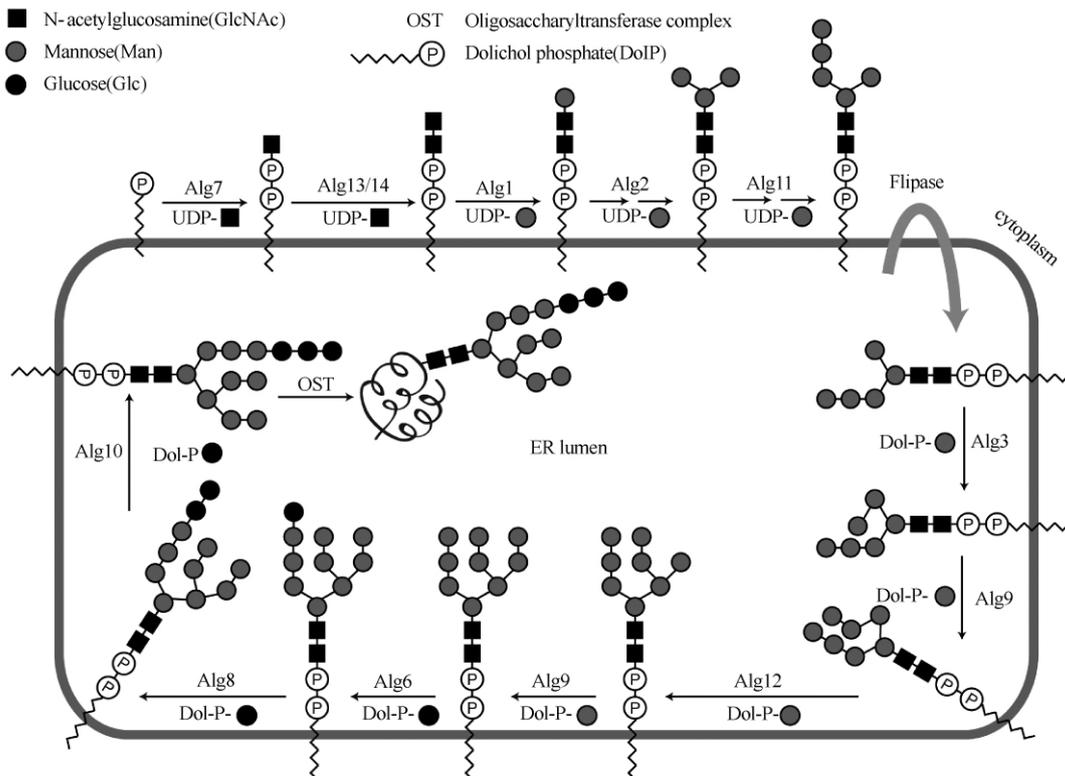


图 3 真核生物的 N-糖基化途径

Fig. 3 N-linked glycosylation in Eukaryotes.

体由多萜醇脂和与其相连的一个焦磷酸基团组成, 后者又连接由 14 个特异性单糖组成的寡糖(图 3)。N-糖基化过程最初的 2 个 N-乙酰葡萄糖胺和 5 个甘露糖基的连接发生在内质网的胞质侧, 由两组酶复合体 Alg7/Alg14/Alg13^[23-25] 和 Alg2/Alg1/Alg11^[26] 催化完成。

此后, 通过一个或一群未知基因编码的翻转酶作用, Man₅GlcNAc₂-Dol 前体穿过内质网双层膜变成朝向内质网内腔, 以 Dol-P-Man 作为供体, 通过酶复合体 Alg3/Alg9/Alg12 依次连接 4 个甘露糖基团, 形成“三天线”结构。在此基础上, 由 Dol-P-Glc 作供体, 通过酶复合体 Alg6/Alg8/Alg10 再连接上 3 个葡萄糖基团, 完成多萜醇寡糖前体的组装。最后, 通过寡糖转移酶将该前体上的聚糖转移到新生肽链的三联序列 AsnXaaSer/Thr (NXS/T) 中的天冬酰胺 (Asn) 残基上。这一系列生化过程在几乎所有真核生物中都是保守的。随后新生的糖肽链上的聚糖先被内质网中的 α -葡萄糖苷酶 I 和 II 切去 3 个葡萄糖, 形成 Man₈GlcNAc, 然后转入高尔基体内侧, 完成蛋白的糖基化。

1.3.2 酵母特异性糖基转移酶的改造: N-糖链分为高甘露糖型、复杂型和杂合型 3 种。哺乳动物分泌的 N-聚糖以复杂型和杂合型为主, 而酵母则倾向于高甘露糖基化。甘露聚糖 (Mannan) 是酵母细胞壁中一种重要的多糖成分, 其相对分子质量为 20000 - 200000, 主链为单链, 由约 50 个 α -甘露糖间以 α -1,6 键形成。主链上有以 α -1,2 和 α -1,3 键连接数目不等的甘露糖侧链, 有些侧链也结合一些基团, 可能是酵母细胞抗原的决定部位。

Nakanishi-Shindo 和 Davidson 等尝试通过在酵母中敲除 *ALG3* 基因, 阻止 α -1,3-和 α -1,6-甘露糖残基连接到 Man₃GlcNAc₂ 核心的 α -1,6 键上(图 4)。但是结果发现在 $\Delta alg3$ 缺陷型酿酒酵母中同时存在 Man₅GlcNAc₂ 和 Man₈GlcNAc₂ 两种糖基结构, 表明 *ALG3* 基因的敲除并不能完全阻止以上酶促反应的进行^[27-28]。此外, Aebi^[29] 和 Cueva^[30] 等还发现 OST 对 Man₅GlcNAc₂ 的识别能力明显低于对正常前体 Glc₃Man₉GlcNAc₂ 的识别, 从而影响了人源化糖蛋白的合成效率。因此, Pourcq 等^[31] 通过过量表达 *ALG6* 使其糖链结构扩展为 Glc₁₋₂Man₅GlcNAc₂ 提高 OST 的转移效率, 随后再通过表达来源于黑曲霉的葡萄糖苷酶 II (GII), 将葡萄糖基除去。此外, Choi

等^[32] 发现在毕赤酵母中表达利什曼原虫 STT3D (OST 复合体的催化亚基) 也可以提高 OST 对糖链的转移效率。

上述改造都是针对内质网中的糖基化过程, 1993 年 Nakanishi-Shindo 等首次提出通过敲除 *OCHI* 和 *MNN1* 基因, 消除酿酒酵母高尔基体中的高甘露糖基化过程, 得到人类糖基化中间体 Man₈GlcNAc(图 4)。*OCHI* 编码的酵母特异性 α -1,6 甘露糖基转移酶将 GDP-甘露糖基转移到 Man₃GlcNAc 核心的 α -1,3 键上, 其产物是酵母继续高甘露糖基化的底物。因此, *OCHI* 的发现和鉴定, 为糖蛋白人源化奠定了基础。然而, 遗憾的是, 虽然 *OCHI* 不是酵母生长的必须基因, 但其敲除会严重延长酵母的生长周期, 导致基因工程菌株失去工业化价值^[33]。作者在研究中也发现, $\Delta alg3 \Delta och$ 双缺陷型酿酒酵母生长延滞期长, 速率低, 易受温度、pH 等环境因素的影响, 但是适当的添加山梨醇可以部分回补细胞生长能力。Man₈GlcNAc₂ 被 α -1,3 甘露糖和磷酸甘露糖进一步修饰, 形成多种糖链形式的聚糖。Chiba^[34] 和 Nakanishi-Shindo^[27] 等通过继续敲除 *MNN1* 和 *MNN4* 基因, 得到了均一的 Man₈GlcNAc₂ N-聚糖, 初步实现了糖链表观结构的均一性。

1.3.3 人类糖基化相关基因的表达和调控: 由于哺乳动物糖蛋白以复杂型和杂合型为主, 为了进一步模拟人类的 N-糖基化途径, 需要表达各种来源于哺乳动物或其他微生物的糖苷酶、糖基转移酶、UDP-寡糖合成酶和糖基转运蛋白等。1998 年 Chiba 等通过在 $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 三重缺陷型酿酒酵母中表达 C-末端连接有 HDEL 内质网滞留信号序列 (Endoplasmic reticulum retention/retrieval tag) 的来源于胞曲霉 (*Aspergillus saitoi*) 的 α -1,2 甘露糖苷酶 (Mannosidase I), 使以 α -1,2 键连接的甘露糖基显著减少, 首次得到人类糖基化中间体 Man₅GlcNAc₂(图 4)。该项研究的重要意义在于, 虽然不能将 Man₈GlcNAc₂ 全部转化为 Man₅GlcNAc₂, 但这是合成复杂型或杂合型糖链的第一步, 是糖蛋白人源化进程中的重大突破。此外, HDEL 细胞定位信号的成功运用为后续外源蛋白的表达提供了可行的思路 and 手段。

2003 年, Choi 等通过共表达 α -1,2 甘露糖苷酶和人类 1,2-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GlcNAcT I), 首次在胞内得到杂合型 N-聚糖结构^[35-36]。

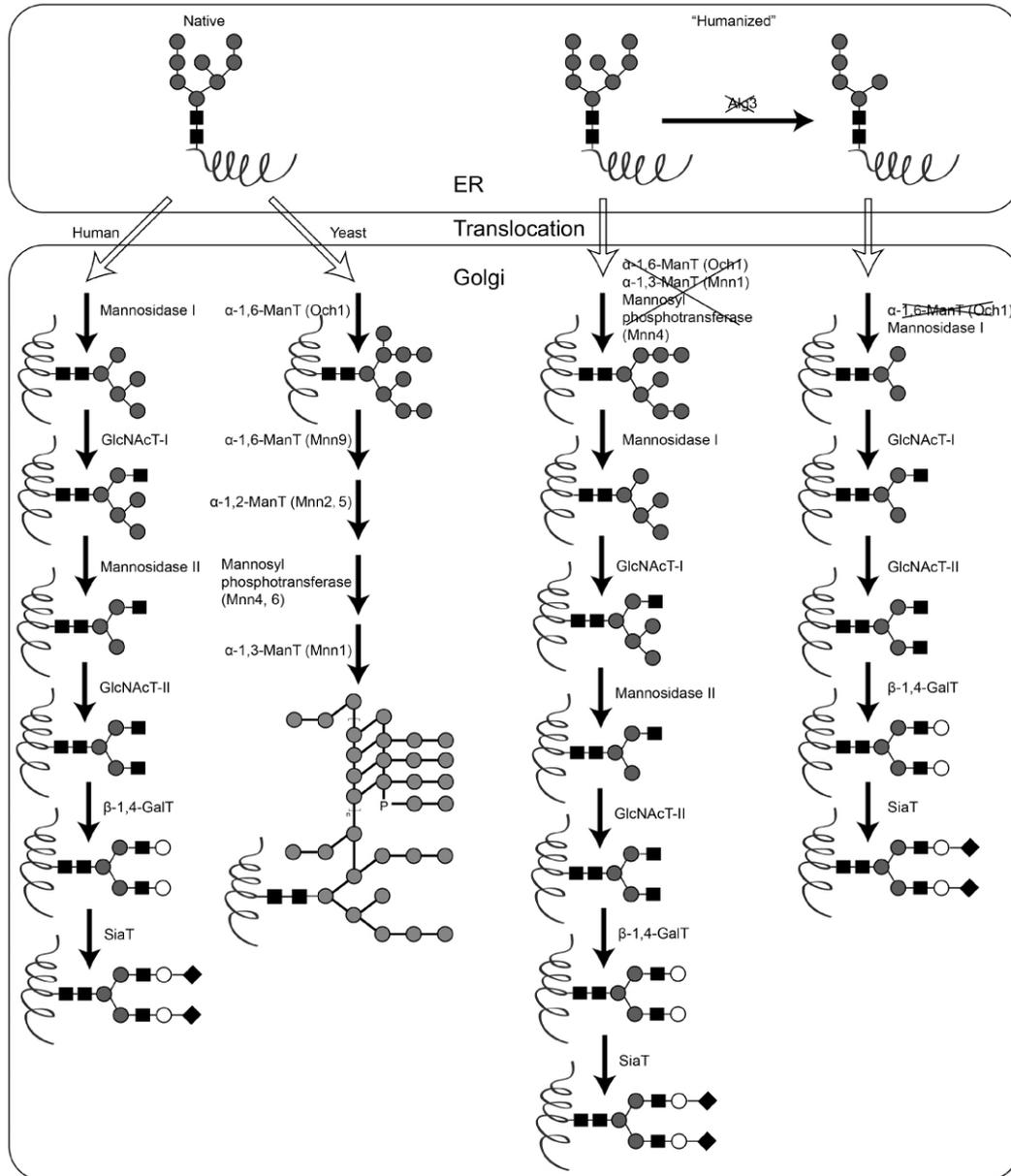


图4 人类和酵母糖基化途径的比较及酿酒酵母 N-糖基化途径的人源化改造

Fig. 4 Comparison of the N-Glycosylation Pathway in humans and yeast, and the humanized N-linked glycosylation pathways in *S. cerevisiae*.

2004年, Bobrowicz^[37]和 Vervecken^[38]等通过表达定位于高尔基体的同时具有 UDP-葡萄糖糖异构酶和 β -1,4-半乳糖基转移酶 (β -1,4-GalT) 活性的融合蛋白,使毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 可以在胞内合成糖链末端被半乳糖修饰的糖蛋白 (图4)。其后, Hamilton 等在 Science 上发表了通过在胞内合成 CMP-唾液酸, CMP-唾液酸转运蛋白和唾液酸转移酶 (SiaT) 的策略,使酵母能够生产糖基末端被唾液酸修饰的糖蛋白^[39]。可惜这一重大突破未见有后续

报道。

综上,研究人员针对利用酵母生产人源化糖蛋白进行了深入研究,发现并鉴定了各种酵母特异性糖基化蛋白,并通过表达来源于人类或其他微生物的糖基化相关基因,初步实现了酵母糖蛋白的人源化。然而,特异性糖基化蛋白的缺失对酵母生理的影响、OST 寡糖转移酶对不同结构糖基识别能力的差异、外源糖基化蛋白表达不稳定和糖基转移酶转化效率较低等问题仍未解决。因此,需要在阐明酵

母糖蛋白人源化相关基因的表达和调控的基础上, 深入研究酵母和人类糖基化机制及其生理作用, 最终实现利用酵母大量生产人源化糖蛋白。

2 展望

糖蛋白广泛的存在于生物体内, 是生命活动的重要物质。蛋白质的糖链形式复杂多样, 与细胞分化、凋亡与癌变、自身免疫、信号转导等密切相关, 对人类健康具有重要作用。哺乳动物表达系统的糖基化类型与人类最为接近, 也是现今最常用的表达载体, 但由于存在基因操作复杂, 培养困难, 成本高, 周期长等问题, 国内外部分科研工作者开始转向研究和开发酵母或细菌表达系统。尽管已经取得了一系列突破性的进展, 细菌的糖基化途径仍未得到完全解析, 加上细菌糖链结构与人类存在较大差异, 利用细菌表达系统开发人源化的医药糖蛋白存在很大的困难。而酵母细胞糖基化途径清晰, 且具有合成生物活性重组糖蛋白所必需的亚细胞器结构和相关基因, 通过对酵母的蛋白糖基化途径进行改造, 生产出人源复杂型的糖蛋白是完全可能的。在此基础上, 进一步设计并在重组酵母中表达出特定的非天然的糖链将有可能获得具有比天然药用糖蛋白更好的生物活性及代谢动力学特性的基因工程产物。此外, 由于酵母的基因操作较为简单, 通过对酵母糖基化途径的改造, 可以对产物的糖基化进行较为严谨的控制, 从而显著减少外源糖蛋白产品的不均一性。相信在充分理解糖基化调控机制的基础上, 利用基因工程技术和系统生物学理论, 开发一个高效的重组表达系统生产医药糖蛋白, 对理论研究和人类健康都有着重要的意义。

参考文献

- [1] Sethuraman N, Stadheim TA. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17 (4) :341-346.
- [2] Sola RJ, Griebenow K. Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs*, 2010, 24 (1) :9-21.
- [3] Muramatsu T. Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *Journal of Biochemistry*, 2000, 127 (2) :171-176.
- [4] Coloma MJ, Trinh RK, Martinez AR, Morrison SL. Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behavior of an anti-(1→6) dextran antibody. *Journal of Immunology*, 1999, 162 (4) :2162-2170.
- [5] Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74 (4) :288-294.
- [6] Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer*, 2001, 84 (Suppl 1) :3-10.
- [7] Waegeman H, Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38 (12) :1891-1910.
- [8] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (11) :1393-1398.
- [9] Durocher Y, Pham PL, St-Laurent G, Jacob D, Cass B, Chahal P, Lau CJ, Nalbantoglu J, Kamen A. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *Journal of Virological Methods*, 2007, 144 (1-2) :32-40.
- [10] Petricciani J, Sheets R. An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, 2008, 36 (6) :359-362.
- [11] Hossler P. Protein glycosylation control in Mammalian cell culture: past precedents and contemporary prospects. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 2012, 127:187-219.
- [12] Jacobs PP, Callewaert N. N-glycosylation Engineering of Biopharmaceutical Expression Systems. *Current Molecular Medicine*, 2009, 9 (7) :774-800.
- [13] Mescher MF, Strominger JL. Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1976, 251 (7) :2005-2014.
- [14] Linton D, Allan E, Karlyshev AV, Cronshaw AD, Wren BW. Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (2) :497-508.
- [15] 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.
- [16] Kowarik M, Numao S, Feldman MF, Schulz BL, Callewaert N, Kiermaier E, Catrein I, Aebi M. N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science*, 2006, 314 (5802) : 1148-1150.
- [17] Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (8) : 3016-3021.
- [18] Pandhal J, Ow SY, Noirel J, Wright PC. Improving N-glycosylation efficiency in *Escherichia coli* using shotgun proteomics, metabolic network analysis, and selective reaction monitoring. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108 (4) :902-912.
- [19] Kowarik M, Young NM, Numao S, Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF, Wacker M, Aebi M. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO Journal*, 2006, 25 (9) :1957-1966.
- [20] Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6 (4) :264-266.
- [21] Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, Fan YY, Reading CA, Chhiba K, Heiss C, Azadi P, Aebi M, Delisa MP. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8 (5) :434-436.
- [22] Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (11) :1409-1414.
- [23] Gao XD, Tachikawa H, Sato T, Jigami Y, Dean N. Alg14 recruits alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (43) :36254-36262.
- [24] Averbeck N, Gao XD, Nishimura SI, Dean N. Alg13p, the catalytic subunit of the endoplasmic reticulum UDP-GlcNAc glycosyltransferase, is a target for proteasomal degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19 (5) :2169-2178.
- [25] Gao XD, Moriyama S, Miura N, Dean N, Nishimura SI. Interaction between the C Termini of Alg13 and Alg14 Mediates Formation of the Active UDP-N-acetylglucosamine Transferase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (47) :32534-32541.
- [26] Gao XD, Nishikawa A, Dean N. Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*, 2004, 14 (6) :559-570.
- [27] Nakanishi-Shindo Y, Nakayama K, Tanaka A, Toda Y, Jigami Y. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from *och1*, *och1 mnn1*, and *och1 mnn1 alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (35) :26338-26345.
- [28] Davidson RC, Nett JH, Renfer E, Li H, Stadheim TA, Miller BJ, Miele RG, Hamilton SR, Choi BK, Mitchell TI, Wildt S. Functional analysis of the ALG3 gene encoding the Dol-P-Man: Man (5) GlcNAc (2)-PP-Dol mannosyltransferase enzyme of *P. pastoris*. *Glycobiology*, 2004, 14 (5) :399-407.
- [29] Aebi M, Gassenhuber J, Domdey H, te Heesen S. Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*, 1996, 6 (4) : 439-444.
- [30] Cueva R, Munoz MD, Andaluz E, Basco RD, Larriba G. Preferential transfer to truncated oligosaccharides to the first sequon of yeast exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae alg3* cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1289 (3) :336-342.
- [31] De Pourcq K, Tiels P, Van Hecke A, Geysens S, Verweken W, Callewaert N. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce glycoproteins homogeneously modified with the universal Man₃GlcNAc₂ N-glycan core. *Plos One*, 2012, 7 (6) :e39976.
- [32] Choi B-K, Warburton S, Lin H, Patel R, Boldogh I, Meehl M, d'Anjou M, Pon L, Stadheim TA, Sethuraman N. Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95 (3) : 671-682.
- [33] Nagasu T, Shimma Y, Nakanishi Y, Kuromitsu J, Iwama K, Nakayama K, Suzuki K, Jigami Y. Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast*, 1992, 8 (7) :535-547.
- [34] Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, Jigami Y, Ichishima E. Production of

- human compatible high mannose-type (Man₅GlcNAc₂) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (41):26298-26304.
- [35] Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li HJ, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (9):5022-5027.
- [36] Gerngross TU, Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li HJ, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischniewski H, Wildt S. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, 2003, 301 (5637):1244-1246.
- [37] Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, Potgieter TI, Nett JH, Hamilton SR, Stadheim TA, Miele RG, Bobrowicz B, Mitchell T, Rausch S, Renfer E, Wildt S. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology*, 2004, 14 (9):757-766.
- [38] Verweken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R. In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (5):2639-2646.
- [39] Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li H, Choi B-K, Hopkins D, Wischniewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 2006, 313 (5792):1441-1443.

Advances in the production of humanized glycoprotein by different expression systems—A review

Sha Xu^{1,2}, Naganish Hideki^{1,2}, Xiaodong Gao^{1,2*}

¹School of Biotechnology, Key Laboratory of Glycobiology and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Therapeutic glycoprotein is increasingly important for human health with new developments of the recombinant DNA technology and the protein glycosylation theory. Most glycoproteins are produced in mammalian cells with high cost and low yield as the bottleneck in production. Bacterial expression system is important but rather difficult by the restriction of both theory and technology. Therefore, yeast glycoprotein expression systems have been established, and they are of the utmost importance. This review summarized N-linked glycosylation processes of the different expression systems and genetic engineering of the glycosylation pathways to “humanized” glycoproteins.

Keywords: therapeutic glycoprotein, glycosylation, humanization, genetic engineering

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Grant Project of Chinese Ministry of Education (313027), by the Self-Determined Research Program of Jiangnan University (JUSRP211A25) and by the Open Project Program of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, China (KLIB-KF201106)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85197003; E-mail:xdgao@jiangnan.edu.cn

Received: 12 September 2012/Revised:8 January 2013