

普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

供药学及相关专业用

生物技术制药

主编 郭葆玉

清华大学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

供药学及相关专业用

生物技术制药

主编 郭葆玉

清华大学出版社

北京

内 容 提 要

本书以生物技术制药的理论和方法学内容为主,对生物技术制药的概念、有关技术及其研究领域的内涵和外延做一全面翔实的介绍。本书共分19章:第1~6章分别介绍了生物技术制药的主要组成,包括基因工程制药、细胞工程制药、酶工程制药、发酵工程制药和蛋白质工程制药等;第7~14章分别介绍了核酸、多肽类药物、治疗性抗体、治疗性细胞株、细胞因子类药物、基因治疗以及与免疫、动植物有关的生物药物;第15~19章分别介绍了分子靶向药物、融合蛋白、治疗性激素、血液制品和治疗性酶、疫苗技术和分子诊断技术等内容。本书内容系统丰富,图文并茂(每章均有五幅以上图,全书100余幅)。可作为高等医药院校大学本科学生、研究生、生物药物新药研发相关工作的从业人员的教材和参考书。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物技术制药/郭葆玉主编. --北京:清华大学出版社,2011.9
(普通高等教育“十二五”规划教材·全国高等医药院校规划教材)
ISBN 978-7-302-26698-3

I. ①生… II. ①郭… III. ①生物制品:药物—制造—高等学校—教材 IV. ①TQ464

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第172516号

责任编辑:罗 健

责任校对:赵丽敏

责任印制:杨 艳

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦A座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:清华大学印刷厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:23.25 字 数:634千字

版 次:2011年9月第1版 印 次:2011年9月第1次印刷

印 数:1~3000

定 价:49.80元

产品编号:040010-01

前 言

PREFACE

自1977年博耶等人首先从大肠杆菌中生产出生长激素释放因子,1982年重组胰岛素被批准正式上市以来,生物制药药物在医药领域的开发显示出巨大的优越性和良好的开端。如今,生物制药药物的生产工艺已有了很大的改进,生产规模也有了很大的发展。同时,一些有望开发成为新药的合成肽、miRNA、融合蛋白、治疗性抗体和个性化治疗药物也将很快成为新一代的有效药物,进入临床。这些药物的出现必将对药物的理念、界定、观念和内涵产生重大的影响。

利用生物制药技术研究制取新药方面已取得了惊人的成就,已有不少药物应用于临床。概括起来有如下几大类: I. 细胞因子类: ① 干扰素类: 我国已广泛使用的主要是 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 干扰素,包括 $\alpha 1b$ 、 $\alpha 2a$ 和 $\alpha 2b$ 干扰素; ② 白介素类: 已在临床应用的有白介素-2 (IL-2)和突变型白介素-2; ③ 肿瘤坏死因子及其受体: 有TNF- α 和TNF- β 两种,是具有重要生物活性的细胞因子; ④ 造血系统生长因子类: 主要品种有粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、巨噬细胞粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素(EPO)、促血小板生成素(TPO)以及干细胞生长因子(SCF)等; ⑤ 生长因子类主要品种有胰岛素样生长因子(IGF)、表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF α 与TGF β)、神经生长因子(NGF)等; ⑥ 重组蛋白质与多肽类激素: 人重组胰岛素(humulin)、人生长激素(rhGH)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和绒毛膜促生长腺激素(HCG)等。 II. 心血管病治疗剂与酶制剂: 主要品种有VIII因子、水蛭素、tpA、尿激酶、链激酶、葡激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、葡萄糖苷酶及Dnase等。 III. 重组疫苗与治疗性抗体: ① 重组乙肝表面抗原疫苗(酵母)、乙肝基因疫苗(重组乙肝表面抗原疫苗,CHO细胞)、AIDS病疫苗和肿瘤疫苗等。需特别指出的是,2009年我国推出H1N1甲型流感疫苗,为防止甲型流感起到了很好的作用; ② 治疗性抗体: 已批准上市的有12种,主要向人源化方向发展,多用于治疗难治性疾病,如预防移植物急性排斥、免疫性疾病和肿瘤等。2007年热销的16种药物中,生物制药蛋白质药物就占了7种,而以下几种生物制药抗体类药物尤为受青睐,分别为①治疗类风湿关节炎的anti-TNF α 抗体Enbrel、Remicade; ②治疗B细胞淋巴瘤的anti-CD20抗体Rituxan; ③治疗乳腺癌的anti-EGFR II抗体Herceptin; ④抗肿瘤血管形成的anti-VEGF抗体Avastin。 IV. 生物药物: 指应用于基因治疗的目的DNA片段重组物; 基因治疗指把外源基因导入机体以达到治疗疾病的目的。目前,FDA已批准100多个基因治疗方案进入临床试验。 V. 反义药物: 福米韦生是FDA批准的第一个反义药物,用于治疗艾滋病的巨噬细胞病毒性视网膜炎。 VI. 多肽类药物: ①抗肿瘤多肽: 如生长抑素已用于治疗消化系统内分泌肿瘤,导向双功能抗肿瘤多肽(PMN)具有导向和长效抑制肿瘤细胞生长的功能。抗肿瘤多肽(ND100)对悬液法接种的在体肿瘤有较好的抑制作用; ②抗病毒多肽; ③多肽疫苗: 如正在开发疟疾多价抗原多肽疫苗,宫颈癌人乳头瘤病毒多肽疫苗已进入II期临床试验。

在实际应用中,生物制药药物受到一定限制,如口服应用时生物利用度低,会受到消化系统酶的破坏,在胃酸作用下不稳定,在体内半衰期较短等,因此只能注射给药或局部用药。为了克服这些缺陷,已开始改为合成这些天然蛋白质的较小活性片段,即所谓“多肽模拟”或“多肽结构域”合成,又叫“小分子结构药物设计”。这类药物可口服,有利于由皮肤、黏膜给药,用于治疗免疫缺陷症、HIV感染、变态反应性疾病、风湿性关节炎等,其制造成本也更低。这种设计思

想也已应用于多糖类药物、核酸类药物和模拟酶的有关研究。小分子药物设计属于第二代结构相关性药物设计,所设计的分子能替代原先天然活性蛋白质与特异靶相互作用。

“十一五”期间,我国生物制药学学科取得如下成绩:2006年吉非替尼(商品名易瑞莎)是第一个问世的针对非小细胞型肺癌的靶向药物。它是一种表皮生长因子抑制剂,具有抑制肿瘤血管生成、促进肿瘤细胞死亡、控制肿瘤细胞转移等作用。目前该药作为晚期肺癌患者的二线、三线治疗药物,已被用于临床。2007年出版的国际知名学术刊物《肿瘤研究》在世界上首次报道了由北京大学、中国科学院合作完成的成果——抗肿瘤双靶点生物制药多肽,它是肿瘤生长过程中发挥重要作用的基质金属蛋白酶(第一靶点)和血管内皮细胞(第二靶点)二者的抑制剂,无放疗、化疗所致的不良反应,而且具有很好的防止肿瘤新生血管生成,抑制肿瘤生长和转移等的治疗作用。2008年,康弘药业集团报告了具有独立知识产权的国家I类新药KH902用于治疗年龄相关性黄斑变性(AMD)的I期临床试验情况。2008年深圳市赛百诺基因技术有限公司研制成功重组人p53腺病毒注射液(今又生),1ml的液体包含了1万亿个重组基因病毒颗粒,并可有效杀灭肿瘤细胞,使癌症患者重燃生命的希望。Tarceva是继吉非替尼之后问世的另一个治疗非小细胞型肺癌靶向药物,它也是一种表皮生长因子抑制剂。除了吉非替尼和Tarceva之外,还有用于治疗肾癌的temsirolimus、索拉非尼和Sunitinib,用于治疗晚期大肠癌的阿瓦斯丁等。“十二五”于今年开始,国家又制定了新的生物制药的发展规划,在生物药物领域,中国已列出10大领域、35类关键技术,力争培育多家大型企业,以实现生物经济强国战略。未来中国将重点发展新兴疫苗、小分子药物、新兴中药、高产优质农作物、生物农药、生物制药业、生物能源、环境生物药物。同时,扩大生物药物产业链,发展生物材料。国家相继出台一系列相关政策,指出了医药行业未来几年明确的战略性发展方向,给予了极大的投入,生物制药业面临良好的发展机遇,真正立足于生物制药业并有一定高技术产品支持的医药企业已表现出良好的增长趋势。预计在今后几年,我国生物制药业将会保持20%~30%的年增长率。与发达国家相比,虽然国内生物医药技术仍存在明显的差距,但生物医药业无疑正处在加速上升阶段,市场潜力巨大。

目前,中国已将生物医药产业作为经济增长点建设行业和高新技术支柱产业来发展,在一些科技发达或经济发达的地区建立了国家级生物医药产业基地、比如上海浦东生物医药开发基地、广东中山健康产业基地等。在深圳、上海、苏州等地,一些生物药物骨干企业已经迅速崛起。我国生物制药产业虽然发展较快,但也存在严重的问题:如源头创新少,投入少,研发力量薄弱,技术创新落后;在药品开发与生产上重复建设现象严重;力量分散,企业规模小,整体生产现代化水平不高,市场开发理念失常,缺乏品牌意识;企业管理相对滞后,技术兼经营性人才匮乏;企业之间缺乏交流和合作,很多项目起点不高,有的厂家只看重利润和追求短、平、快的项目。高科技创新药物距发达国家相对滞后。

在清华大学出版社的帮助、指导下,我们组织了国内一些名校的著名专家学者合著此书。本教材做到了理论与实践结合,基础与前沿并重,内涵与外延共展,如对基因表达产物的分离纯化、抗体药物、基因疫苗和多肽药物的设计等都有非常详细的介绍。这是一本既适合大学本科教学,又便于一些研究生、临床医师和生物药物从业人员参考的教材用书。

特别感谢大连医科大学刘克辛院长、孟强老师,上海交通大学苗志奇教授,哈尔滨医科大学周宏博教授,广东医学院臧林泉教授,复旦大学杨青教授,沈阳药科大学康宁副教授,第二军医大学潘卫教授和王栋博士在百忙中认真撰写稿件,第二军医大学博士后江筠一丝不苟地逐字逐句修改稿件,他们在专业上精益求精的精神为本书的高质量完成奠定了基础。

郭葆玉

2011年8月于上海

目 录

CONTENTS

第1章 生物技术制药总论	1
第1节 基因工程与基因工程制药	
步骤	1
一、基因工程	1
二、基因工程制药的基本步骤	3
三、基因工程制药的具体步骤	3
第2节 细胞工程制药	9
一、细胞工程	9
二、细胞工程制药	9
第3节 酶工程制药	12
一、酶与酶工程	12
二、酶工程制药	12
第4节 发酵工程制药	13
一、发酵与发酵工程	13
二、发酵工程制药	13
第5节 蛋白质工程制药	14
一、蛋白质与蛋白质工程	14
二、蛋白质工程制药	14
第6节 生物医学工程与生物信息	
工程	16
一、生物医学工程	16
二、生物信息工程	16
思考题	17
参考文献	18
第2章 基因工程制药	19
第1节 基因克隆表达	19
一、大肠杆菌表达系统	19
二、酵母表达系统	27
三、昆虫细胞表达系统	30
第2节 各种产物表达形式采用的	
分离纯化方法	31
一、大肠杆菌细胞内不溶性表达产物	
.....	31
二、分泌型的表达产物	32
三、大肠杆菌细胞内可溶性表达产物	
.....	33
四、大肠杆菌细胞周质表达蛋白	33
第3节 表达产物的活性、安全性	
评价、稳定性考察	33
一、生物活性(效价)测定	33
二、安全性评价	34
三、稳定性	34
四、产品	34
思考题	35
参考文献	35
第3章 细胞工程制药	36
第1节 细胞、细胞工程与细胞	
工程制药	36
一、细胞	36
二、细胞工程	37
三、细胞工程制药	38
第2节 动物细胞工程制药	39
一、动物细胞的全能性	39
二、动物细胞工程制药中的转基因	
与细胞培养技术	40
第3节 植物细胞工程制药	42
一、植物细胞的特点	42
二、植物细胞工程药物研究	43
三、植物细胞融合与核移植技术	44

四、转基因植物药物技术	45
五、植物细胞培养工程	48
六、植物细胞的染色体工程	49
第4节 细胞工程制药的应用、前景	
和存在的问题	50
一、临床用细胞工程药物	50
二、人源化抗体的研制与“分子药田”工程	51
三、细胞工程药物的安全性	51
思考题	53
参考文献	53

第4章 酶工程制药 54

第1节 酶工程制药概述	54
一、酶及酶催化特性	54
二、影响酶催化反应的主要因素	55
三、酶的分类	56
四、酶工程和酶工程制药	57
第2节 酶工程制药技术	57
一、药用酶的生产技术	57
二、药物的酶法生产技术	63
第3节 酶工程制药的现状与前景	71
思考题	75
参考文献	75

第5章 发酵工程制药 76

第1节 发酵工程制药基础	76
一、微生物发酵生产的药物	76
二、发酵制药工业中的微生物	77
第2节 微生物制药发酵工艺	85
第3节 微生物发酵工艺过程的控制	90
思考题	96
参考文献	97

第6章 蛋白质工程制药 98

第1节 蛋白质工程制药的概念	99
-----------------------------	----

一、蛋白质工程制药研究的核心内容和基本概念及方法	99
二、改造蛋白质的一些方法	99
第2节 蛋白质工程制药方法	100
一、随机诱变	101
二、体外重组	101
三、蛋白质工程制药方法的常用目的	104
第3节 蛋白质工程制药现状	105
一、蛋白质定点突变改造	106
思考题	109
参考文献	109

第7章 核酸类药物 110

第1节 反义核酸药物	110
一、反义药物的作用机制	110
二、反义药物的设计策略	111
三、反义药物的作用特点	112
四、反义核酸药物的合成与纯化	112
第2节 短小干扰RNA (siRNA)	114
一、RNAi的作用机制	115
二、RNAi的特点	117
三、siRNA的制备方法	117
第3节 miRNA	118
一、miRNA的基本特征	118
二、miRNA的作用机制	118
三、siRNA和miRNA的异同	119
第4节 核酸类药物的临床试验现状与前景	120
一、反义核酸类药物的临床试验现状与前景	120
二、RNAi的临床试验现状与前景	121
思考题	123
参考文献	123

第8章 多肽类药物 125

第1节 多肽类药物的概念和优点	125
一、多肽、多肽药物的概念	125

二、多肽药物的优点	127
第2节 多肽药物的制备	128
一、固相合成法	128
二、液相合成法	129
三、多肽合成仪法	130
四、酶解法制备多肽	130
第3节 多肽药物的稳定性、检测、 制剂与给药途径	131
一、多肽药物的稳定性	131
二、多肽类药物制剂的分析方法	132
三、多肽类药物的缓释制剂研究	133
四、多肽药物的给药途径	133
第4节 多肽药物的应用	135
一、多肽疫苗	135
二、抗肿瘤多肽	135
三、抗病毒多肽	135
四、多肽导向药物	135
五、抗菌性活性肽	135
六、细胞因子模拟肽	135
七、用于心血管疾病的多肽	136
八、其他药用小肽	136
九、诊断用多肽	136
思考题	138
参考文献	138

第9章 治疗性抗体药物 139

第1节 抗体概述	139
一、抗体的基本结构	139
二、抗体的基因组成	142
三、抗原识别特异性的产生	143
四、亲和力与结合力	144
五、类别转换	145
六、药物代谢动力学	146
七、效应功能	146
第2节 治疗性小型化抗体	149
第3节 单链抗体(ScFv)、单域抗体 	150
第4节 重组人鼠嵌合单克隆抗体 	153

第5节 重组人源化单克隆抗体.....	154
一、人单克隆抗体	155
第6节 抗体药物与化疗药物 的联合应用	156
思考题	158
参考文献	158

第10章 治疗性细胞株 159

第1节 治疗性细胞株——干细胞 疗法	159
第2节 树突状细胞共培养的细胞 因子	162
第3节 治疗性克隆	164
第4节 核移植与重编程	168
参考文献	175

第11章 细胞因子类药物 176

第1节 重组人干扰素	177
一、概述	177
二、IFN的性质、结构和功能	177
三、IFN的生物活性和作用机制	179
四、IFN的基因工程制备	181
五、IFN的临床应用及不良反应	183
第2节 重组人白细胞介素	184
一、概述	184
二、各类IL	184
第3节 粒细胞集落刺激因子	188
一、结构与性质	189
二、G-CSF、GM-CSF的临床应用	189
三、G-CSF、GM-CSF的不良反应	190
四、基因重组人G-CSF和GM-CSF	190
第4节 促红细胞生成素	190
一、EPO基因和分子结构	191
二、EPO的产生及性质	191
三、重组人EPO的制备	192
四、临床应用	193
五、EPO的不良反应	194
第5节 组织型纤溶酶原激活剂.....	195
一、概述	195

二、性质、结构和功能	195
三、生物学活性及作用机制	197
四、基因工程制备 t-PA	197
五、重组 t-PA 的临床应用	198
第 6 节 肿瘤坏死因子	198
一、概述	198
二、TNF 的分子结构与功能	199
三、TNF 的生物活性和临床应用	200
四、TNF 的制备	201
思考题	201
参考文献	202

第 12 章 基因治疗

第 1 节 基因治疗研究现状	203
一、基因治疗的现状	203
二、目前基因治疗存在的问题	205
第 2 节 基因转移的方法	206
一、基因治疗的概念及步骤	206
二、基因转移方法	207
第 3 节 基因治疗的应用与安全性	211
一、基因治疗的应用	211
二、基因治疗的安全性	217
思考题	219
参考文献	219

第 13 章 动物基因工程药物

第 1 节 动物细胞培养	221
一、动物细胞培养的几个基本概念	221
二、动物细胞培养的基本条件	222
三、动物细胞形态	224
四、哺乳动物细胞冷冻保存	225
五、动物细胞的解冻复苏	225
六、动物细胞的传代培养	225
第 2 节 动物转基因技术	226
一、动物细胞转基因技术	226
二、转基因动物制备技术	227
第 3 节 动物反应器与动物基因工程药物	229
一、转基因动物细胞生物反应器	229

二、乳腺生物反应器	234
思考题	235
参考文献	235

第 14 章 植物基因工程药物

第 1 节 植物基因工程	236
一、植物表达载体的构建	237
二、植物转化	244
第 2 节 植物基因工程药物	246
一、植物基因工程重组蛋白药物	246
二、植物次生代谢工程	249
思考题	252
参考文献	252

第 15 章 分子靶向药物

第 1 节 概述	253
第 2 节 细胞信号转导通路分子靶向药物	254
一、Ras/MAPK 通道抑制剂	255
二、蛋白激酶 C 抑制剂	255
三、环氧合酶-2 选择性抑制剂	257
四、端粒酶抑制因子	259
五、法基尼转移酶抑制剂	260
第 3 节 原癌基因和抑癌基因的分子靶向药物	260
一、原癌基因表达的特点	260
二、原癌基因的结构改变形式及其表达激活	261
第 4 节 细胞因子受体分子靶向药物	262
第 5 节 抗肿瘤血管形成分子靶向药物	262
第 6 节 小型化抗体靶向药物	263
第 7 节 自杀基因	267
参考文献	269

第 16 章 融合蛋白药物

第 1 节 重组人肿瘤坏死因子受体—Fc 融合蛋白	270
--	-----

一、肿瘤坏死因子 270

第2节 重组抗肿瘤融合蛋白 273

一、融合蛋白与肿瘤 273

二、融合蛋白与恶性肿瘤的演进 273

三、融合蛋白在肿瘤治疗、预防研究中的应用 274

第3节 重组人血清清蛋白-干扰素 275

一、干扰素的产生及其结构特点 276

二、干扰素的治病原理 276

三、已上市的衍生干扰素产品 280

第4节 重组人成纤维细胞生长因子 281

一、 α FGF 及 FGFR 的结构和功能 281

二、生物学功能 283

三、基因工程表达 α FGF 现状 284

四、 α FGF 用于临床应注意的问题 285

第5节 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 285

一、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的分子生物学特征 285

二、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的临床应用 288

三、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子转基因表达研究 288

第6节 白细胞介素 290

一、种类和结构 290

二、生物学活性 291

三、IL 的功能 292

思考题 296

参考文献 296

第17章 治疗性激素 297

第1节 胰岛素 297

一、胰岛素分子 297

二、胰岛素受体与信号转导 299

三、重组 DNA 技术制备胰岛素产品 300

四、用胰岛素合成细胞治疗糖尿病 301

第2节 人生长激素 301

一、生长激素释放因子与抑制因子 302

二、GH 受体、GH 的生理作用与 GH 的治疗作用 303

三、重组 huGH 与垂体性矮小 304

四、huGH 的代谢作用 305

五、GH、泌乳与排卵 305

第3节 促性腺激素 306

一、重组促性腺激素 306

二、促性腺激素在兽医学中的应用 308

三、促性腺激素释放激素 308

第4节 其他批准用于临床的重组激素 309

一、重组人甲状旁腺激素 309

二、重组降钙素 310

三、重组促甲状腺素 310

思考题 311

参考文献 312

第18章 血液制品和治疗性酶 313

第1节 血液代用品 313

一、右旋糖酐 314

二、清蛋白 314

三、明胶蛋白 315

四、携氧血液替代品 316

第2节 凝血因子和血友病 318

一、凝血因子 VIII 318

二、凝血因子 IX、VII_a 321

第3节 治疗用酶 323

一、抗凝血酶 (AT) 323

二、溶栓剂 324

三、超氧化物歧化酶 329

四、其他治疗用酶 330

思考题 332

参考文献 332

第19章 疫苗技术和分子诊断技术 333

第1节 疫苗技术 333

一、传统疫苗制剂	333
二、基因工程疫苗技术与 DNA 疫苗 ...	334
三、艾滋病疫苗	336
四、肿瘤疫苗	337
五、佐剂技术及作用模式	339
第 2 节 分子诊断技术	342
一、分子诊断的概念及原理	343
二、分子诊断的常用技术方法	343

第 3 节 分子诊断的临床应用	350
一、分子诊断与遗传疾病	350
二、分子诊断与传染性疾病	352
三、分子诊断与肿瘤	354
四、分子诊断与个性化治疗	355
思考题	355
参考文献	355

第1章

生物技术制药总论

学习要求

1. 掌握生物制药学的基本内涵是什么，从现代广义的角度看，生物制药学应该是怎样的一门学科？其基本研究内容包括哪些方面？
2. 熟悉基因工程制药的基本步骤主要有哪些？目的基因的获取有哪些方法？载体是什么？克隆、表达中的酶切、连接、转化、阳性克隆的筛选等主要步骤和方法是什么？
3. 了解细胞工程制药、酶工程制药、发酵工程制药和蛋白质工程制药的含义、研究目标和基本的研究步骤有哪些？

从现代泛义的角度看，生物制药学应该是：运用生物学、微生物学、生物化学、细胞生物学、医学等学科的研究成果，从生物体、生物组织、细胞、细胞分泌产物、体液等，综合利用微生物学、化学、生物化学、生物技术、药学等科学的原理和方法制造用于疾病的预防、治疗和诊断的生物制品的一门学问。生物制药的原料是以天然的生物材料为主，包括微生物、人体、动物、植物、海洋生物等。随着生物技术的发展，按人们意愿事先设计的人工制得的生物原料成为当前生物制药原料的主要来源，如用改变基因结构或基因重组制得的微生物或其他细胞原料、免疫法制得的动物原料等。生物药物的特点是生物活性高，不良反应小，营养价值高。生物药物主要有蛋白质、核酸、糖类、脂类等。这些物质的组成单元为氨基酸、核苷酸、单糖、脂肪酸等，对人体不仅无害而且还是重要的营养物质。目前，生物药物的研究队伍迅速不断壮大，发展也很快，前景看好。

现代生物制药学的研究内容应包括：①基因工程制药；②细胞工程制药；③酶工程制药；④发酵工程制药；⑤蛋白质工程制药。目前新出现的生物医学工程和生物信息工程虽然不属于直接的药物学的范畴，但与生物制药学的研究内容有着非常紧密的联系和信息知识交叉，属于全新的生物制药学的概念和内容，故本章也将其列入生物制药学的范围而简述之。

第1节 基因工程与基因工程制药步骤

一、基因工程

基因工程又称基因拼接技术和DNA重组技术，是在基因水平上的一系列技术操作，基因工程其最重要的核心是：以分子遗传学为理论基础，以分子生物学和微生物学的现代方法为手段，

将不同来源的基因 (DNA 分子), 按预先设计的蓝图, 在体外构建杂种 DNA 分子, 从而将生物的某些基因通过基因载体运送到另一种生物的活细胞中, 并使之无性繁殖 (称之为“克隆”) 和显现正常功能 (称之为“表达”), 从而改变生物原有的遗传特性, 获得新品种, 生产新产品。基因工程技术为基因的结构和功能的研究提供了有力的手段。

(一) 基因工程制药的理论基础

基因工程制药的理论基础有以下 10 大要点:

- (1) 基因由核苷酸和脱氧核苷酸组成的密码子 (遗传信息携带者) 组成。
- (2) 遗传密码子的通用性。即 20 种氨基酸每个氨基酸由 3 个碱基组合成 1 个密码子。
- (3) 碱基互补配对原则。这些是不同物种进行基因横向传递 (即基因工程技术以及病毒侵染) 的基础。
- (4) 不同的基因具有相同的物质基础。
- (5) 基因是可切割的。
- (6) 基因是可以转移的。
- (7) 多肽与基因之间有对应关系。
- (8) 基因通过复制可以把遗传信息传递给下一代。
- (9) 基因表达。
- (10) 基因转录前后、蛋白质翻译前后的调控理论。

理论应用: 医学、制药学、转基因动物、转基因植物、物种改良、食品等方面。

(二) 基因工程制药的技术基础

基因工程制药的技术基础有以下 5 大要点:

- (1) 限制性内切酶、DNA 连接酶、反转录酶的发现。
- (2) 质粒、基因工程载体的出现 (图 1-1)。

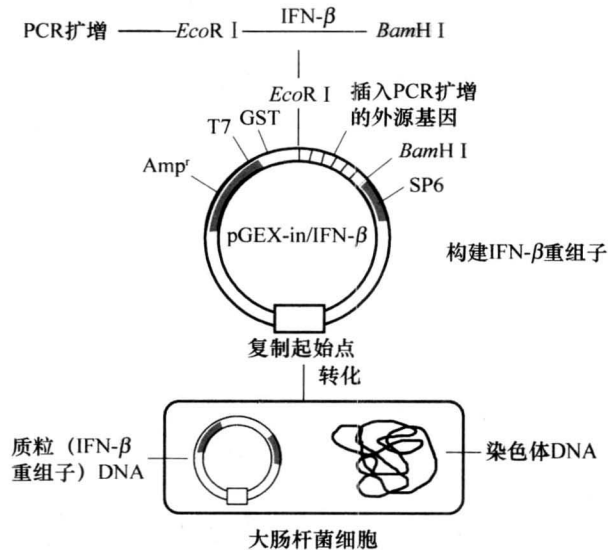


图 1-1 融合表达载体质粒 pGEX-in 及 PCR 片段的插入和质粒作为载体的重组子构建与转化示意图

- (3) DNA 重组技术。
- (4) 转化、转染、转导、核移植、基因转移的技术。

(5) 表达产物的分离纯化及理化、生物鉴定技术。

(三) 基因工程制药的目标

基因工程制药的目标是：对不同生物的遗传基因，根据人们的意愿，进行基因的切割、拼接和重新组合，再转入生物体内，产生出人们所期望的产物，或创造出具有新的遗传特征的生物类型。世界上第一批重组 DNA 分子诞生于 1972 年，次年几种不同来源的 DNA 分子装入载体后被转入到大肠杆菌中表达，标志着基因工程制药正式登上历史舞台。从此，基因工程制药开始改变了传统生物科技的被动状态，使得人们可以克服物种间的遗传障碍，定向培养或创造出自然界所没有的新的生命形态，以满足人类社会的需要。

二、基因工程制药的基本步骤

基因工程制药的基本步骤主要由两大部分组成，即上游技术、下游技术。

(一) 上游技术

- (1) 目的基因的获取与扩增。
- (2) 构建 DNA 重组体。
- (3) DNA 重组体转入宿主菌。
- (4) 阳性工程菌株的筛选与鉴定。
- (5) 小规模工程菌的扩增。

(二) 下游技术

- (1) 工程菌发酵表达。
- (2) 表达产物的分离纯化工艺。

无论是上游技术，还是下游技术，都要进行以下质量控制：

- (1) 结构组成，各种理化、生化性质；
- (2) 安全性、稳定性和生物学活性。

三、基因工程制药的具体步骤

(一) 目的基因的获取

获取目的基因的方法基本上有 3 种。

1. 获自基因文库

(1) 制作基因文库 (gene library)：提取总 DNA，用限制性内切酶将总 DNA 切成小片段再将各片段分别克隆在质粒或噬菌体载体上，便构成了该生物的基因文库，这可看作目的基因是从基因所在的生物体中直接取得，把这些质粒转化到细菌，随着细菌繁殖而复制，这个过程又称为基因克隆 (gene clone)。

(2) 构建 cDNA 文库：真核生物的基因含有不表达的内含子，而有时内含子序列很长，因此这种基因难以和载体 DNA 结合。这种方法是在核糖体合成多肽的旺盛时期将含有目的基因的 mRNA 的多聚核糖体提取出来，分离出 mRNA，然后以 mRNA 为模板用反转录酶合成单链 DNA，再经 DNA 聚合酶作用产生双链 DNA，即 cDNA。人的胰岛素和血红蛋白的结构基因就是用这一方法获得的。这种方法专一性强，但操作过程比较麻烦。反转录法就是先分离纯化目的基因的 mRNA，再反转录成 cDNA，然后进行 cDNA 的克隆表达，具体包括：

- (1) RNA 的提取与纯化。
- (2) cDNA 第一链的合成。

- (3) cDNA 第二链的合成。
- (4) cDNA 的克隆。
- (5) 将重组体导入宿主细胞。
- (6) cDNA 文库的鉴定。
- (7) 目的 cDNA 克隆的分离和鉴定。

2. PCR 扩增技术 PCR 技术是 DNA 扩增技术，它能在比较短的时间内产生大量的 DNA，有人认为在获取目的基因后才使用 PCR 技术，故严格来讲，它是在已经获得目的基因基础上的放大和富集技术，不应列入目的基因的获取方法之列，但笔者认为，它完全有理由被看成为大量获取目的基因的方法之一。因为它可以获取任何一段目的基因。此外，现在所用的 Marason-PCR、race、Adaptor 和 poly (A⁺) 等结合 PCR 技术还大量用在克隆新基因和欲知基因方面，就更应该看作是目的基因获取的重要方法之一了。

3. 根据已知氨基酸序列人工化学合成 DNA 根据基因表达产物的氨基酸顺序，搞清楚基因的核苷酸序列，然后按“图纸”先合成一个个含少量核苷酸的 DNA 片段，再利用碱基对互补关系使它们形成双链 DNA 片段，再用连接酶把小的双链 DNA 片段逐个按顺序连接起来，使双链逐渐加长，最后得到一个完整基因。这种方法专一性非常强，基因合成效率大大提高。但这种方法目前仅限于合成核苷酸对较少的一些简单基因，而且事先要把它们的核苷酸序列搞清楚。这种合成基因的方法还有一个很大的优点，就是可以人工合成自然界不存在的新基因。

人工化学合成基因的限制：

- (1) 不能合成太长的基因。目前 DNA 合成仪所合成的寡核苷酸片段仅为 50~60bp，因此，只适用于克隆小分子肽的基因。
- (2) 遗传密码的简并使选择密码子困难。用氨基酸顺序推测核苷酸序列，得到的结果可能与天然基因不完全一致，易造成中性突变。
- (3) 费用高。因为获取目的基因的方法从严格意义上说仍为有模板后的逆转录法，故不单另列出一个问题赘述。

(二) 目的基因的克隆重组与表达

该步骤的首要任务是提取供体生物目的基因，再将取得目的基因用“分子剪刀”（限制性内切酶）剪切供体 DNA 分子，把它切成一些比基因略长的片段，然后再从中找出包含所需目的基因的 DNA 片段。到目前为止，人们用这种方法已分离出 40 种大肠杆菌蛋白质基因、鸡的组蛋白基因等。

1. 载体 载体 (vector) 由于目的基因自身常无 DNA 复制所需信息，在细胞分裂时不能复制给子细胞，就会丢失，所以人们要把它连在一些能独立于细胞染色体之外复制的 DNA 片段上，这些 DNA 片段就叫载体。载体 (图 1-2) 是在基因工程重组 DNA 技术中将 DNA 片段 (目的基因) 转移至受体细胞的一种能自我复制的 DNA 分子。3 种最常用的载体是细菌质粒、噬菌体和动植物病毒。

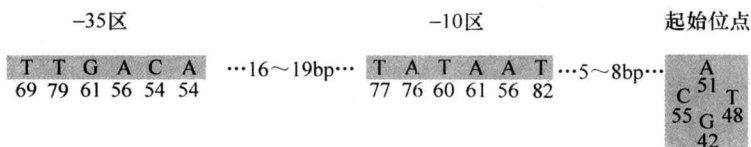


图 1-2 启动子由 3 个元件组成示意图

(1) 克隆载体 (cloning vector): 克隆载体通常采用从病毒、质粒或高等生物细胞中获取的 DNA 作为克隆载体, 在载体上插入合适大小的外源 DNA 片段, 并注意不能破坏载体的自我复制性质。将重组后的载体引入到宿主细胞中, 并在宿主细胞中大量繁殖。克隆载体的基本元件有: ① 在细菌或酵母等中的复制起始点; ② 有多克隆位点 (切割并插入外源基因用); ③ 抗性或其他特殊基因 (筛选用); ④ 有克隆的目的基因。

(2) 表达载体: 表达载体 (expression vector) 上主要包含一些控制目的基因表达的元件, 有启动子、增强子、终止子等:

1) 启动子: 启动子 (promoter; P) 是 DNA 分子上能与 RNA 聚合酶结合并形成转录起始复合体的区域, 在许多情况下, 还包括促进这一过程的调节蛋白的结合位点。启动子是基因的一个组成部分, 控制基因表达 (转录) 的起始时间和表达的程度。启动子由核苷酸组成, 本身并不控制基因活动, 而是通过与称为转录 (transcription) 因子的这种蛋白质结合而控制基因活动的。转录因子通过 RNA 聚合酶 (polymerases) 的活动指导着 RNA 复制。RNA 聚合酶同启动子结合的区域称为启动子区。将各种原核基因同 RNA 聚合酶全酶结合后, 用 DNase I 水解 DNA, 最后得到与 RNA 聚合酶结合而未被水解的 DNA 片段, 这些片段有一个由 5 个核苷酸 (TATAA) 组成的共同序列, 以其发现者的名字命名为 Pribnow 框 (Pribnow box), 这个框的中央位于起点上游 10bp 处, 所以又称 -10 序列 (-10 sequence), 后来在 -35 bp 处又找到另一个共同序列 (TT-GACA)。Hogness 等在真核基因中又发现了类似 Pribnow 框的共同序列, 即位于 -25~-30bp 处的 TATAAAAG, 也称 TATA 框 (TATA box)。TATA 框上游的保守序列称为上游启动子元件 (upstream promoter element, UPE) 或上游激活序列 (upstream activating sequence, UAS)。另外在 -70~-78bp 处还有一段共同序列 CCAAT, 称为 CAAT 框 (CAAT box)。

原核生物中 -10 区同 -35 区之间核苷酸数目的变动会影响基因转录活性的高低, 强启动子一般为 16~19bp, 当间距小于 15bp 或大于 20bp 时都会降低启动子的活性 (图 1-2)。

在真核基因中, 有少数基因没有 TATA 框。没有 TATA 框的真核基因启动子序列中, 有的富集 GC, 即有 GC 框; 有的则没有 GC 框。GC 框位于 -80~-110bp 处的 GCCACACCC 或 GGGCGGG 序列。

2) 增强子: 增强子 (enhancer) 指增加同它连锁的基因转录频率的 DNA 序列。增强子是通过启动子来增加转录的。有效的增强子可以位于基因的 5' 端, 也可位于基因的 3' 端, 有的还可位于基因的内含子中。增强子的效应很明显, 一般能使基因转录频率增加 10~200 倍, 有的甚至可以高达上千倍。例如, 人珠蛋白基因的表达水平在巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 增强子作用下可提高 600~1 000 倍。增强子的作用同增强子的取向 (5'~3' 或 3'~5') 无关, 甚至远离靶基因达几千 kb 也仍有增强作用 (图 1-3)。



图 1-3 SV40 病毒增强子示意图

3) 终止子: 终止子 (terminator) 是 DNA 分子中终止转录的核苷酸序列。而终止密码子是作为转录终止的信号, 在图 1-4 中, DNA 分子下面一条被从左到右转录, 从画线 DNA 转录来的 RNA 片段形成发夹环, 因为两框中核苷酸含有互补碱基顺序, 这就迫使 DNA/RNA 杂交区域裂开, 因为随后包括氢键结合较弱的多聚腺苷酸和尿嘧啶 mRNA 分子就从这个位置

脱离下来。

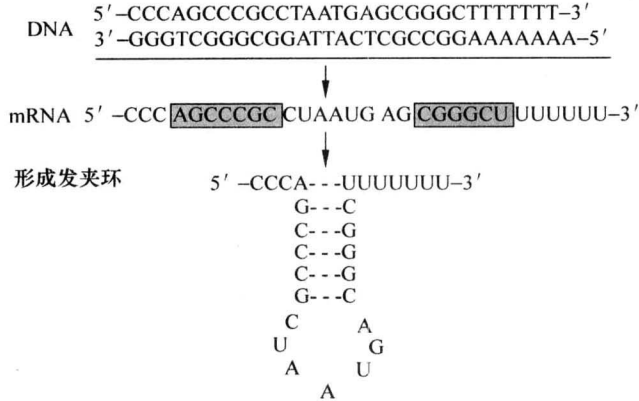


图 1-4 终止子形成示意图

终止密码子：UAA. UGA. UAG；启动子和终止子是不能转化为信使 RNA。

(3) 构建过程：目的基因、启动子、终止子、标记基因常用细菌质粒进行构建，构建过程中运用限制性核酸内切酶切割出与目的基因相合的末端（多为黏性末端，也有平末端），采用 DNA 连接酶连接，导入生物体实现表达。表达载体构建的基本过程包括（图 1-5）：

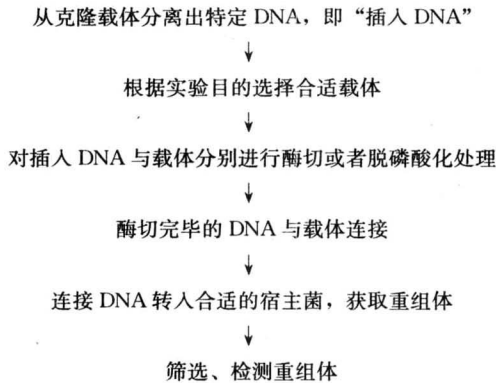


图 1-5 表达载体构建的基本过程示意图

归纳整个基因工程流程示意图见图 1-6。

2. 限制性核酸内切酶

(1) 定义：限制性核酸内切酶是可以识别 DNA 的特异序列，并在识别位点或其周围切割双链 DNA 的一类内切酶，简称限制酶。

(2) 命名：限制酶的命名是根据细菌种类而定（表 1-1），以 *EcoR* I 为例：

表 1-1 限制性核酸内切酶的命名

E	<i>Escherichia</i>	属
co	<i>coli</i>	种
R	RY13	品系
I	首先发现	此类细菌中发现的先后顺序