



高等院校药学与制药工程专业规划教材
宁波市高校特色教材

生物药物的制备 与质量控制

PREPARATION AND QUALITY
CONTROL OF BIOLOGICAL DRUG

王素芳 等主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

.. 013048429

TQ464-43

07

高等院校药学与制药工程专业规划教材
宁波市高校特色教材

生物药物的制备与质量控制

Preparation and Quality Control of Biological Drug

王素芳 朱秋华 何琳 张捷 主编



北航

C1656564



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

TQ 464-43

07

图书在版编目(CIP)数据

生物药物的制备与质量控制 / 王素芳等主编. —杭州:浙江大学出版社, 2013. 2

ISBN 978-7-308-11124-9

I. ①生… II. ①王… III. ①生物制品—制备—教材
②生物制品—质量控制—教材 IV. ①TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 022582 号

生物药物的制备与质量控制

王素芳等 主编

责任编辑 周卫群

封面设计 俞亚彤

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 浙江省良渚印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 20.25

字 数 493 千

版 印 次 2013 年 2 月第 1 版 2013 年 2 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-11124-9

定 价 38.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88925591

前 言

生物制药是一门既古老又年轻的学科。人类使用生物药物治疗疾病有着悠久的历史；随着科技的发展，世界上生物技术三分之二以上的成果应用于医药领域，生物药物的种类迅速增加。

生物制药已成为当今最活跃和发展最迅速的领域之一。世界各国特别是发达国家非常重视生物制药产业的发展，欧美、亚洲一些国家都出台了全面发展生物技术产业的战略和强有力的扶持政策。在中国，国家和地方政府不断加大政策支持力度，中国的生物制药业发展迅速。鉴于此，各大高校纷纷在生物技术、生物工程专业开设生物制药课程。

在多年的教学实践中，编者发现国内出版的生物制药教材主要分为《生物制药工艺学》与《生物制药技术》两类。《生物制药工艺学》教材偏重传统生物药物工艺的介绍，涉及的前沿技术、前沿药物不多，对药物的质量控制涉及的也很少；《生物制药技术》多是侧重制药过程中使用到的各种生物技术的介绍，不适合生物技术、生物工程专业的学生使用。而且这些教材多是沿用传统的教材编写模式，体现的是以教为主的教学方法。

本教材在内容方面作了全面、实用和前沿的兼顾，以生物药物的种类——生化药物、抗生素、生物制品为主线，介绍了各类生物药物的生产及质量控制方法。一方面，压缩生化药物和抗生素篇幅，避免多数同类教材对类似制备工艺的简单罗列和介绍；另一方面，突出新技术、新工艺在生物制药方面的应用，加大了生物制品类药物的篇幅，如抗体、疫苗、重组蛋白类药物、血液制品等分别作为一章，进行详细介绍；此外，力求紧密结合生物制药行业，多举典型案例，使学生通过案例深化对基本知识理论的理解，提高思考、分析和解决问题的能力。

为了体现以能力培养为核心的教学方法，本教材将合作性学习理念融入教材的编写中。每章都有能力目标，强调能力培养；每章都附有合作讨论题目，可通过合作讨论培养学生自主学习能力，引导学生吸纳生物制药行业中的前沿性知识，提高学生的创新能力和解决问题的能力。

此外，教材中有一些前沿的或趣味性的引导案例、知识拓展、延伸阅读模块，有利于提高学生对该课程的学习兴趣，提高学生的学习能力。

利用好本教材可实现学生被动接受知识向主动合作性学习知识的观念转变；实现侧重获取知识的教育向增强创造性教育的转变；实现学科专业素质培养向综合素质教育的转变；实现基础理论知识的掌握与学习能力、合作能力、分析解决问题能力提升的同步。

本教材适用于普通本科生物技术、生物工程、药学等相关专业生物制药方向的三年级或四年级学生使用，也可作为相关专业研究生、生物制药专业学生和科技人员的参考用书。

在本教材编写的过程中，得到了钱国英、尹尚军和陈永富等教授的大力支持和协助。此

外,王汇、吴江南等同学为本教材做了大量的文字整理、校对工作。在此,对他们的付出表示衷心的感谢。本书大量参考了书中所列参考文献,借此出版之际,对各位著作者表示诚挚的谢意。

敬请各位老师与同学对书中的缺点和错误提出宝贵意见,谢谢!

编 者

2012年11月

目 录

第一章 绪 论	1
第一节 生物药物	2
第二节 生物制药	11
第三节 药物质量控制基础	16
第二章 生化药物	51
第一节 氨基酸类药物	53
第二节 多肽与蛋白质类药物	59
第三节 核酸类药物	66
第四节 糖类药物	72
第五节 脂类药物	76
第六节 维生素及辅酶类药物	82
第七节 生化药物的质量控制	85
第三章 抗生素药物	94
第一节 抗生素概述	95
第二节 抗生素的生产	100
第三节 β -内酰胺类抗生素	105
第四节 氨基糖苷类抗生素	108
第五节 大环内酯类抗生素	109
第六节 基因工程在抗生素生产中的应用	111
第七节 抗生素药物的质量控制	113
第四章 重组蛋白类药物	125
第一节 重组蛋白类药物概述	127
第二节 重组蛋白类药物的生产过程	130
第三节 基因工程干扰素的生产	139
第四节 重组 IL-2 的生产	142
第五节 重组蛋白类药物质量控制	144

第五章 抗 体	173
第一节 多克隆抗体	174
第二节 单克隆抗体	177
第三节 基因工程抗体	183
第四节 抗体的质量控制	189
第六章 疫 苗	216
第一节 疫苗概述	217
第二节 传统疫苗的生产	226
第三节 基因工程疫苗的研制	238
第四节 疫苗的质量控制	242
第七章 血液制品	264
第一节 全血与血液成分制品	266
第二节 血浆蛋白制品	270
第三节 血液代用品	276
第四节 血液制品的质量控制	279
附 录	292
附录 I 生物制品术语及名词解释	292
附录 II 生物制品生产检定用菌毒种管理规程	296
附录 III 生物制品分批规程	300
附录 IV 生物制品分装和冻干规程	301
附录 V 生物制品包装规程	303
附录 VI 生物制品贮藏和运输规程	305
附录 VII 生物制品生产和检定用动物细胞基质制备及检定规程	306
参考文献	316

第一章 绪 论

【知识目标】

掌握生物药物的分类、特点、原料来源和用途；
掌握生物制药的概念及技术分类；
了解生物药物的发展过程及趋势。

【能力目标】

培养学生的学习兴趣、自学能力、分析问题能力；
培养学生的团结协作精神。

【引导案例】

2005 年全球前 20 大畅销生物技术药物销售额超过 370 亿美元

某市场研究公司 La Merie S. L 周一发布报告称,2005 年全球前 20 大畅销生物技术药物中有 19 个药物销售额超过了 10 亿美元。增长最为强劲的一类生物技术药物是治疗性抗体,如贝伐单抗(阿瓦斯丁)增长 141%,阿达木单抗增长 64%,群司珠单抗(赫塞汀)增长 48%。该类药物在前 20 强中占据 6 席。

红细胞生成素仍然是销售额最大的一类生物技术药物(疫苗除外),但增长已趋缓,并有从素蛋白向长效的糖基化产品转换的趋势。主要的抗肿瘤抗体产品的销售额(67.7 亿美元)已接近 TNF 类产品(76.4 亿美元)。销售额排名前 20 大产品中唯一的一个抗病毒抗体本年度销售首次突破 10 亿美元。

(资料来源:中国医药数字图书馆网,2006 年 2 月 17 日发布)

重组蛋白药物的明星产品——红细胞生长素

EPO 最早由美国安进生物工程公司在上世纪 90 年代初开发上市。该品 1989 首次引入临床后迅速被广大患者所接受,是当时世界范围内临床疗效最显著、销售额最可观的一种生物技术产品。EPO 与干扰素(α 与 β 型)、人胰岛素、人生长激素等合称为美国生物药物中的“四大金刚”。

1989 年安进(Amgen)公司的首个 EPO 产品(Epogen)获得 FDA 的批准,用于由慢性肾衰、多发性骨髓瘤、骨髓异常增殖综合征和艾滋病引起的贫血。1999 年、2000 年销售额已分别近 17.6 亿美元和 19.6 亿美元。2002 年、2003 年销售额更是分别高达 22.6 亿美元和 24.4 亿美元。

安进公司于2001年6月推出第二代重组促红细胞生成素类药物——“高糖基化”促红素产品阿法贝泊汀(Darbepoetin Alfa),该品在美国和欧洲的商品名分别为Aranesp和Nespo。其结构与EPO的重要差异在于它带有两个含羟链唾液酸,故无论是静脉注射,还是皮下注射,其半衰期都延长了2倍,这有利于简化给药方案。上市第二年,阿法贝泊汀的全球销售额已达4.2亿美元,2003年飙升为15.4亿美元。

安进公司的EPO类药物(包括Aranesp以及Epogen)在2003年、2006年的销售额高达50亿美元和70亿美元,占公司毛收入的一半,是安进最主要的摇钱树,也使Amgen公司一跃成为全美最大的生物工程公司。

另外,强生公司的促红细胞生成素Procrit/Eporex也表现不俗,2001年、2002年和2003年销售额分别达34.42亿美元、42.69亿美元和39.84亿美元。

在中国,EPO上市早期,销售占主导地位的厂家为美国安进公司和日本东凌公司。经过几年的发展,目前国产EPO成功地占据市场主导地位。国内已有20多家单位获准生产红细胞生成素。2007年,中国EPO的年销售额约5亿元。

近些年来,以基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程为代表的现代生物技术发展迅猛,已广泛地应用于工业、农牧业、医药、环保等众多领域,产生了巨大的经济和社会效益。其中,医药卫生领域是现代生物技术应用得最广泛、成绩最显著、发展最迅速、潜力也最大的一个领域。目前,有60%以上的生物技术成果集中应用于医药产业,用以开发特色新药或对传统医药进行改良,由此引起了医药产业的重大变革,生物制药也得以迅速发展。

第一节 生物药物

生物药物是指利用生物体、生物组织、体液或其代谢产物,综合利用化学、生物技术、分离纯化工程和药学等学科的原理与方法加工、制成的预防、治疗和诊断疾病的药物。

生物药物原料以天然的生物材料为主,包括人体、动物、植物、海洋生物、微生物等。随着生物技术的发展,人工制得的生物材料成为当前生物制药原料的重要来源,如用免疫法制得的动物原料、用基因工程技术制得的微生物或动植物细胞原料。

【知识拓展】

药品、保健品、化妆品与消毒产品区别

目前,很多药店里除了销售药品外,还卖保健品、化妆品和消毒产品,而且这些产品的外包装看上去和药品的差不多。保健品、化妆品、消毒产品与药品有什么区别,怎样区分它们呢?

1. 概念的区别

药品是指用于预防、治疗、诊断人的疾病,有目的地调节人的生理机能并规定有适应症或者功能主治、用法和用量的物质。

保健品(功能食品)是食品的一个种类,具有一般食品的共性,能调节人体的机能,适用于特定人群食用,但不以治疗疾病为目的。

化妆品是指以涂抹、喷洒或者其他类似方法,散布于人体表面的任何部位,如皮肤、毛

发、指(趾)甲、唇齿等,以达到清洁、保养、美容、修饰和改变外观,或者修正人体气味,保持良好状态为目的的化学工业品或精细化工产品。

消毒产品是起杀灭和消除病原微生物作用的一种产品。消毒产品包括消毒剂、消毒器械(含生物指示物、化学指示物和灭菌物品包装物)、卫生用品和一次性使用医疗用品。消毒产品是针对环境中的病原微生物,而不是针对人的疾病的一种产品,是一种防病的产品,而不是治病或诊断疾病的产品。

2. 审批门槛高低不同

药品的配方必须通过严格的药理、病理和毒理检查和多年的临床实验观察,经国家批准后,方可投入生产和投放市场。其他3种没那么严格的要求,审批相对容易。

3. 质量控制不同

药品必须在药厂中进行生产,所有药品的生产必须达到药品生产质量管理标准(GMP),生产工艺严格,终产品应达到国家药品标准,药品说明书详细而完整。其他3种没有这么严格的要求。

4. 区分方法

区分它们很简单,主要是看批准文号。药品的批准文号是“国药准字”;保健食品的批准文号是以“卫食健字”开头;化妆品的批准文号是以“卫妆特字”或“卫妆进字”开头;消毒产品的批准文号是以“卫消进字”或“卫消字”开头。对于非国药准字的产品,宣传其治疗效果是违反规定的。

一、生物药物的分类

根据生物药物的特点、制备方法等不同,一般将生物药物分为生化药物、生物制品和抗生素三大类。

1. 生化药物

生化药物是指从生物体制备的内源性生理活性物质。这类物质都是维持正常生命活动所必需的,包括氨基酸、多肽、蛋白质、糖类、脂类、核酸、维生素及激素等。

正常机体在生命活动中能保持健康状态,就是依赖于机体内不断产生的这类物质的调控作用。机体一旦受到外界环境的影响或其本身老化使某种活性物质的产生或作用受到阻碍时,就会发生与该物质有关的疾病,如胰岛素分泌障碍时就会发生糖尿病。此类药物的特点:一是来源于生物体;二是人体的基本生化成分。因此,医疗应用中显示出高效、合理、毒副作用极小的临床效果,受到极大重视。

由于生物体间存在种属特异性,因而,许多内源性生理活性物质的应用受到了限制。如用人生长素治疗侏儒症有特效,但用猪脑垂体制备的生长素则对人体无效。

2. 生物制品

2010年版《中国药典》规定,生物制品是以微生物、细胞、动物或人源组织和体液等为原料,应用传统技术或现代生物技术制成,用于人类疾病的预防、治疗和诊断。生物制品一般具有免疫学反应或平衡生理作用,其制造也有别于生化药物,它更多地涉及免疫学、预防医学与微生物学。

世界卫生组织从检定方面给生物制品下的定义为,效价和安全性检定仅凭物理化学的方法或技术不足以解决问题而必须采用生物学方法检定的制品。根据此定义,抗生素、维生

素及激素等不属生物制品的范畴。

人用生物制品包括细菌类疫苗(含类毒素)、病毒类疫苗、抗毒素及抗血清、血液制品、细胞因子、生长因子、酶、体内及体外诊断制品,以及其他生物活性制剂,如毒素、抗原、变态反应原、单克隆抗体、抗原抗体复合物、免疫调节剂及微生态制剂等。如由重组 DNA 技术制成的干扰素(IFN)、白细胞介素(IL)、集落刺激因子(CSF)、红细胞生成素(EPO)等都属于生物制品。

生物制品的质量控制要求特别严格,其生产过程、生产用水、所有原料及辅料除了应符合现行《药品生产质量管理规范》(GMP)和《中华人民共和国药典》要求外,还应符合《中国生物制品规程》和《中国生物制品主要原辅材料质量标准》的要求。采用强毒菌株(鼠疫杆菌、霍乱弧菌、炭疽杆菌等)、芽孢菌、强毒病毒株生产生物制品时,应使用专门设备,设隔离生产区;操作人员应有防护设施。

3. 抗生素

抗生素是指生物在生命活动中产生的(或并用其他方法衍生的)在低微浓度下能选择性地抑制他种生物机能的次级代谢产物及其衍生物。

抗生素的生产主要是利用微生物发酵,有些从植物、海洋生物中提取的抗生物质如小檗碱、海星皂苷也属于抗生素,只能用化学方法合成的抗菌药不是抗生素。此外,在抗生素的定义中还包含一个重要的限制条件,即低微浓度,如乙醇在高浓度下也有杀菌或抑菌作用,但不属于抗生素。

实际上由于各学科的发展、交叉和渗透,并受习惯的影响,生化药物、生物制品和抗生素有时并无明确的界线。像干扰素、白细胞介素等细胞因子也符合生化药物的定义,有人就将其归类为生化药物。随着现代生物制药技术的发展和运用,上述三者(特别是生化药物与生物制品)的关系越来越密切,其内涵也愈来愈接近。

二、生物药物的特性

1. 在生产、制备中的特殊性

(1) 原料中的有效物质含量低

杂质种类多且含量高,因此提取、纯化工艺复杂。如胰腺中胰岛素含量仅为 0.002%,还含有多种酶、蛋白质等杂质,提纯工艺就很复杂。

(2) 稳定性差

生物药物的分子结构中一般具有特定的活性部位,生物大分子药物是以其严格的空间构象来维持其生物活性功能的,一旦遭到破坏,就失去其药理作用。由于生物药物原料及产品均为营养价值高的物质,因此极易染菌、腐败,从而造成有效物质被破坏,失去活性,并且产生热原或致敏物质等。引起活性破坏的因素有生物性的破坏(如被自身酶水解等)和理化因素的破坏(如温度、压力、pH、重金属等)。因此在生产过程中要注意低温、无菌操作、添加蛋白酶抑制剂、EDTA 等保护剂。

2. 检验上的特殊性

(1) 质量控制严格

有些药物(如细胞因子药物)极微量就可产生显著的效应(如 α 干扰素 10~30 μ g/剂量),任何药物性质或剂量的偏差,都可能贻误病情甚至造成严重危害,因此质量控制非常严

格,不仅要有理化检验指标,更要有生物活性检验指标。这也是生物药物生产的关键。

(2)检测方法多样

任何一种单一的分析方法都无法确保药物的安全。它需要综合生物化学、免疫学、微生物学、细胞生物学和分子生物学等多门学科的相关理论和技术,才能切实保证一些药物的安全有效。

(3)检测环节多

特别是对于基因工程药物,除鉴定最终产品外,还要从基因的来源、菌种、原始细胞库等方面进行质量控制,对培养、纯化等每个环节都要严格把关。

三、生物药物的原料来源

生物药物的原料包括人体、植物、动物、微生物以及海洋生物。对于生物技术制药来说,不同原料来源的生物药物对生物技术的要求有所不同。例如人类来源的生物药物对基因工程、蛋白质工程要求较高;植物原料来源的生物药物对植物基因工程、植物细胞培养、植物组织培养要求较高。

1 人体

人体来源的生物药物一般归类于生物制品,主要包括血液制品、胎盘制品和尿液制品三大类。

血液制品包括红细胞、白细胞、血小板和冰冻血浆、血浆成分制品及体细胞活性成分制品。血浆中含有多种蛋白质和多肽成分见表 1-1。但目前开发的主要是白蛋白和 IgG 等少数几种产品,其余百余种小量和微量的蛋白、多肽成分还有待于进一步的开发。

此外,人体液细胞(红细胞、白细胞、淋巴细胞、血小板、成纤维细胞等)的生物活性物质具有极重要的生理功能。用人体液细胞生产的活性物质主要有干扰素、白细胞介素-2、超氧化物歧化酶等少数几个品种。对于体液细胞中生长因子等研究的主要意义在于搞清楚其结构和功能,以使用生物技术进行生产,即使已投产的品种,例如干扰素、白细胞介素等,已逐步被基因工程产品取代。

表 1-1 血浆情况表

项 目	含 量
血液占人体体重的量	8%
血浆占全血的量	50%
血浆中水分占血浆的量	92%
血浆中蛋白质占血浆的量	6%~7%
白蛋白+IgG 占血浆总蛋白的量	65%
其他百余种蛋白成分含量占血浆总蛋白的量	35%

人胎盘制品主要有人胎盘丙种球蛋白、人胎盘白蛋白、人胎盘 RNA 酶抑制剂、绒膜促乳激素(HCS)等,它们的研究亦有重要进展。此外,从健康男性尿液中可以制备尿激酶、激肽释放酶、尿抑胃素、蛋白酶抑制剂、睡眠因子、集落刺激因子(CSF)和表皮生长因子(EGF)

等。从妊娠妇女与绝经期妇女的尿液中,可制备绒毛膜促性腺激素等。

人体来源的生物药物不易产生如免疫反应等副反应,但药物原料的来源有限。

2. 动物

动物原料主要有牛、猪、羊等的器官、组织、腺体、血液、毛角、皮肤等,其次是各种小动物。这类原料的来源丰富且健康、新鲜。这类原料品种繁多,可以制备出人体所需要的各种活性物质,是生产生物药物的主要资源。

几十年来,人们从动物资源中开发出的生物药物种类繁多,构成了生物药物的主要部分。用动物原料可以生产酶及辅酶、多肽及蛋白质激素、核酸及其降解物、糖类、脂类药物等多个种类的多种生化药物。

动物与人类的种族差异较大,因此活性物质的结构也有一定的差异。特别是蛋白质类药物在化学结构和空间结构上都会有不同程度的差别,不同来源的蛋白质注射于人体内要产生抗原反应,严重者会有生命危险。因此,对此类药物的安全性研究要特别引起重视,同时也要重视药效问题。

3. 植物

随着现代科学理论与技术的迅速发展,对于植物药物有效成分的研究引起了特别重视,形成了“天然药物化学”研究新领域。根据不完全统计,全世界大约有 40% 的药物来源于植物。

药用植物中具有药物功能的物质种类繁多,结构复杂。除小分子的各种天然有机化合物以外,还含有多种生物大分子活性物质,如蛋白质、多肽、酶、核酸、糖类和脂类等。但目前应用植物作原料制备蛋白质、多肽、酶类的药物品种不多,这是由于这些生物大分子物质在结构上与人类种族差异很大,免疫反应强烈。已有的药物也多用于口服和外用。

4. 微生物

微生物是生物药物的重要来源,其应用给医药工业创造了巨大的医疗价值和经济效益。利用微生物生产的药物有抗生素、多糖、氨基酸、酶以及酶抑制剂、生物调节剂等。

微生物药物的利用是从人们熟知的抗生素开始的。1941 年青霉素在美国开发成功,标志着抗生素时代的开创,也标志着微生物药物时代的到来。

微生物药物的新时代是以酶抑制剂的研究为开端,目前已拓展到免疫调节剂、受体拮抗剂、抗氧化剂等多种生理活性物质的筛选和开发研究,其研究成果令人瞩目。尤其是具有显著降血脂作用的胆固醇生物合成抑制剂 HMG-CoA、还原酶抑制剂洛伐他汀、普伐他汀以及免疫抑制剂环孢菌素 A、雷帕霉素 FK506 等的开发成功,使人们从认为难以自微生物代谢产物中继续找到新抗生素的悲观情绪中得到解放。由于近年来各种新的筛选模型的应用,每年继续有约 500 种新化合物和一些老化合物的新生理活性被发现。从微生物中寻找活性代谢产物仍是获得新药的一个重要途径。

5. 海洋生物

海洋生物来源的药物,又称海洋药物。国外自 20 世纪 60 年代开始对海洋天然药用活性物质进行深入的研究,从海洋藻类、微生物、海绵、棘皮动物、腔肠动物、软体动物、鱼类等海洋生物中分离和鉴定了数千种海洋天然物质,它们的特异化学结构多是陆地天然物质无法比拟的。许多物质具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗凝血等药理活性作用,为海洋新药开发研究打下了基础。

目前,已从海洋生物如海藻、腔肠、软体动物中分离了多种活性物质。如从海藻中已生产出褐藻酸钠、烟酸甘露醇酯、六硝基甘露醇等多个品种,用于抗肿瘤、防治心血管疾病等;从海葵中分离出具有抗癌作用的 Polytoxin,从软珊瑚中分离出的具有较强抗癌活性的环二肽;从软体动物中分离的活性物质有多糖、多肽、毒素、酶、凝集素等,它们分别具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌、降血脂、止血和平喘等生理功能。

6. 基因重组体

(1) 大肠杆菌

由于对大肠杆菌的分子遗传学研究较深入,而且其生长迅速,所以目前它仍是基因工程研究中采用最多的原核表达体系。由于大肠杆菌自身的特点,其表达的重组产物的形式多种多样,有细胞内不溶性表达(包涵体)、细胞内可溶性表达、细胞周质表达等,极少数情况下还可分泌到细胞外。不同的表达形式具有不同的表达水平,且会带来完全不同的杂质。

大肠杆菌中的表达不存在信号肽,产品多为胞内产物,提取时需破碎细胞,故细胞质内其他蛋白质也释放出来,因而造成提取困难。由于分泌能力不足,真核蛋白质常形成不溶性的包涵体,表达产物必须在下流处理过程中经过变性和复性才能恢复其生物活性。在大肠杆菌中的表达不存在翻译后修饰作用,故对蛋白质产物不能糖基化,因此只适于表达不经糖基化等翻译后修饰仍具有生物功能的真核蛋白质,在应用上受到一定限制。由于翻译常从甲硫氨酸的 AUG 密码子开始,故目的蛋白质的 N 端常多余一个甲硫氨酸残基,容易引起免疫反应。此外,大肠杆菌会产生很难除去的内毒素,还会产生蛋白酶而破坏目的蛋白质。

(2) 酵母

酵母菌是研究基因表达调控最有效的单细胞真核微生物,其基因组小,仅为大肠杆菌的 4 倍,世代时间短,有单倍体、双倍体两种形式。酵母繁殖迅速,可以廉价地大规模培养,而且没有毒性。基因工程操作与原核生物相似。现已在酵母中成功地建立了几种有分泌功能的表达系统,能够将所表达的产物直接分泌出酵母细胞外,从而大大简化了产物的分离纯化工艺。表达产物能糖基化,特别是某些在细菌系统中表达不良的真核基因,在酵母中表达良好。在各种酵母中,以酿酒酵母的应用历史最为悠久,研究资料也最丰富。目前已有不少真核基因已经在酵母中获得成功克隆和表达,如干扰素、乙肝表面抗原基因等。

虽然各种微生物从理论上讲都可以用于基因的表达,但由于克隆载体、DNA 导入方法以及遗传背景等方面的限制,目前使用最广泛的宿主菌仍然是大肠杆菌和酿酒酵母。一方面对它们的遗传背景研究得比较清楚,建立了许多适合于它们的克隆载体和 DNA 导入方法,另一方面许多外源基因已在这两种宿主菌中得到表达成功。

(3) 哺乳动物细胞

哺乳动物细胞已成为生物技术药物研发主要采用的基因表达系统。由于外源基因的表达产物可由重组细胞分泌到培养液中,细胞培养液成分完全由人控制,从而使产物纯化变得容易。哺乳动物细胞分泌的基因产物是糖基化的,接近或类似于天然产物。但动物细胞生产慢,因而生产率低,而且培养条件苛刻,费用高,培养液浓度较稀。

哺乳动物细胞已成为生物技术药物最重要的表达或生产系统,这种局面仍将持续并且其所占比例有逐年扩大趋势。FDA 在 2000 年以后批准的创新生物技术药物,用酵母表达的有 2 种,用大肠杆菌表达的产品只有 4 种,而通过动物细胞培养生产的则有 22 种,除了两种组织工程产品外,其余都是蛋白类产品,这些蛋白都是分子量大、二硫键多、空间结构复杂

的糖蛋白,只有使用 CHO 等哺乳动物细胞表达系统,这些蛋白的生产才成为可能。美国之所以在生物制药领域遥遥领先,最主要的原因就是其哺乳动物细胞表达和生产的产物是其生物制药的主力军,而我国哺乳动物细胞表达的产物寥寥无几,这也是我国与欧美国家生物制药领域的主要差距。

(4) 转基因动物

转基因动物是一种个体表达反应系统,代表了当今药物生产的最新成就,也是最复杂、最具有广阔前景的生物反应系统。就通过转基因动物家畜来生产基因药物而言,最理想的表达场所是乳腺。因为乳腺是一个外分泌器官,乳汁不进入体内循环,不会影响到转基因动物本身的生理代谢反应。

将药用蛋白质基因连接到乳汁蛋白质基因的调节元件下游,将连接产物显微注射到受精卵或胚胎干细胞,转基因胚胎长成个体后,在泌乳期可以源源不断地提供目的基因的产物(药物蛋白质),不但产量高,而且表达的产物已经过充分修饰和加工,具有稳定的生物活性。作为生物反应器的转基因动物又可无限繁殖,故具有成本低、周期短和效益好的优点。

用转基因牛、羊等家畜的乳腺表达人类所需蛋白基因,相当于建一座大型制药厂,这种药物工厂具有投资少、效益高、无公害等优点。目前,多种由转基因家畜乳汁中分离的药物蛋白正用于临床试验。2009 年 2 月,美国食品药品监督管理局首次批准了用转基因山羊奶研制而成的抗血栓药物 Atryn 上市,治疗一种被称为遗传性抗凝血酶缺乏症的疾病。这种新药的推出,有望拉开用转基因动物器官作为药物工厂的序幕,未来几年类似药物将会相继上市。我国目前已有乳铁蛋白、白蛋白、凝血因子等进入临床试验阶段,首个转基因动物生产的药物有望在 5 年内上市。

(5) 转基因植物

此前人们已经开始利用人体细胞或细菌等其他转基因生物体进行实验,并已经成功研发出了一些药物,但利用转基因植物开发药物还相对滞后。

利用转基因植物生产药物,就是先把相关基因引入某种植物中,然后使转基因植物生长繁殖,再从中提取出药物所需的生物活性物质,用来治疗和预防包括艾滋病、狂犬病和肺结核病在内的一些主要疾病。与传统的抗生素和疫苗的生产相比,借助转基因植物制药不仅成本低,而且产量大。作为一种新型生物反应器,转基因植物可以安全、经济、有效地生产各种重组蛋白。目前,以此作为大规模的重组药物生产平台备受瞩目,把一些药用蛋白和疫苗生产移向农场已成为制药产业重点开发的领域。

目前,以转基因植物作反应器,生产价格昂贵的抗体、疫苗、药物等的研究取得了长足的进展,但仍处于实验室研究阶段。例如,美国已在 14 个州试种了 300 多种药用转基因作物,其中有些已获准临床应用,如治疗囊状纤维变性、非何杰金氏淋巴瘤、B 型肝炎的转基因作物,但是还未批准 1 例药用转基因植物商业化应用。表达量低、下游处理复杂、糖基化结构改变是植物反应器中经常遇到的困难,这些困难限制了植物表达重组药物蛋白的商业化发展。

四、生物药物的用途

生物药物广泛用作医疗用品,在医学、预防医学、保健医学等领域都发挥着重要作用。其用途大致可分为四大类:

1. 治疗

治疗疾病是生物药物的主要功能。生物药物对许多常见病、多发病有着很好的疗效。尤其对于疑难杂症,如肿瘤、神经退化性疾病、心脑血管疾病、自身免疫性疾病、冠心病、内分泌障碍等,生物药物的治疗效果是其他药物不可比拟的。

目前肿瘤的治疗主要采用化疗,化疗最大的问题就是“敌我不分”。在杀死癌细胞的同时,也杀死正常细胞。针对这一问题提出的导向治疗就是利用抗体寻找靶标,把药物准确引入病灶,而不伤及其他组织和细胞。目前研发的生物技术药物中有 40% 用于肿瘤的治疗。

神经退化性疾病如老年痴呆症、帕金森氏症、脑中风的治疗将越来越依靠生物制药的发展。目前治疗这类疾病的有效药物非常有限,尤其是治疗不可逆脑损伤的药物更少,胰岛素生长因子、神经生长因子、溶栓活性酶的研制为克服这些疾病带来了希望。

许多炎症由自身免疫缺陷引起,如哮喘、风湿性关节炎、多发性硬化症,全世界每年用于风湿性关节炎的医疗费用达上千亿美元,治疗这类顽固疾病的高效基因药物市场前景非常广阔。在自身免疫性疾病中,艾滋病(AIDS)是对人类危害最大的恶性疾病之一,人们已将征服艾滋病的希望寄托于生物技术药物。

2. 预防

控制传染性疾病,最主要的手段就是预防,而接种疫苗被认为是最行之有效的措施。已有的几十种细菌性疫苗和病毒性疫苗,如预防结核的卡介苗,用于免疫和控制危害极大的小儿麻痹症的脊髓灰质炎(脊灰)疫苗等,都已取得了良好的效果。人类控制和消灭传染病最成功的范例是天花的免疫预防。全世界联合起来,采用天花疫苗接种预防,世界卫生组织于 1979 年 10 月 26 日宣布世界上已经完全消灭了天花。1988 年全球发起根除脊髓灰质炎行动以来,世界范围内脊灰的发病率已降低了 99%,从 1988 年报告的 350000 例降低到 2007 年的 1300 例。

尽管疫苗在大量疾病的预防、治疗中起着非常重要的作用,但目前仍有许多难治之症(如癌症、艾滋病等)没有疫苗或现有疫苗不够理想,需要进行更加深入的研究。新型疫苗的研制是生物药物开发的一个重要内容。

【知识拓展】

天花的预防历史

天花又名痘疮,是一种传染性较强的急性发疹性疾病。我国宋代就有人痘接种萌芽的可能性,到了明代,随着对传染性疾病的认识加深和治疗痘疹经验的丰富,正式发明了人痘接种术。其方法包括:用棉花蘸取痘疮浆液塞入接种儿童鼻孔中;或将痘痂研细,用银管吹入儿童鼻内;或将患痘儿的内衣脱下,着于健康儿身上,使之感染。18 世纪中叶,我国所发明的人痘接种术已传遍欧亚各国。

1796 年,英国医师爱德华·詹纳,观察到了挤牛奶的工人感染了牛痘(牛痘是牛的一种天然轻型传染病)病毒后,不再得天花的现象,并且用牛痘苗进行实验,发明了牛痘接种法。从此,牛痘接种法逐步取代了人痘接种法,用来预防天花。

1979 年 10 月 26 日,联合国世界卫生组织在内罗毕宣布,全世界已经消灭了天花病,并且为此举行了庆祝仪式。

3. 诊断

大部分临床诊断试剂都来自生物药物,这也是生物药物的重要用途之一。目前,诊断试剂是生物制品开发中最活跃的领域,许多疾病的诊断,病原体的鉴别、机体中各种代谢物的分析都需要各种诊断测试试剂。如早孕试纸、AIDS 病诊断试剂盒等。生物药物诊断的特点是速度快、灵敏度高和特异性强。现已成功使用的有免疫诊断试剂、单克隆抗体诊断试剂、酶诊断试剂、放射性诊断药物和基因诊断药物等。

根据诊断是否在体内进行,可分为体内诊断和体外诊断。用于体内诊断的有结核菌素、卡介菌纯蛋白衍生物、锡克氏毒素等,利用此类抗原刺激机体产生迟发型变态反应来判断机体感染状态;体外诊断制品通过检测取自机体的某一部分(如血清)来判断疾病或机体功能。

体外生物诊断试剂,按检测方法分类,现市场上主要有酶联免疫诊断试剂、金标快速检测试剂、PCR 分子诊断试剂、检测芯片等。按产品分类,主要有以下几类:病毒性肝炎系列、性传播疾病系列、优生优育系列、其他病毒系列、细菌检测系列、肿瘤标志系列。

以下列表 1-2,主要介绍中国主要的诊断试剂种类和厂家。

表 1-2 中国主要的诊断试剂种类和厂家一览表

品 种	主要厂家
与乙型肝炎病毒检测相关的试剂盒	北京万泰、艾康、厦门新创、北京希波、郑州博赛、上海阿尔法、北京耀华、上海浩源、广州蓝星、华美生物、复星实业、上海明华、上海宏锦、上海科华、厦门安普利、上海申友、深圳匹基、深圳达尔安、爱恩地蓝
与丙型肝炎病毒检测相关的试剂盒	深圳匹基、上海复华、华美生物、上海科华、北京医大肝病所、中山生物、上海飞龙、北京万泰、上海永华、兰州蓝十字、深圳月亮湾、郑州百纳、沈阳惠民、北京现代高达、北京耀华
与结核分支杆菌检测相关的试剂盒	华美生物、上海宏锦、深圳匹基、上海万达、广州蓝星、深圳达尔安、复星实业、厦门安普利、上海奥普
与淋球菌检测相关的试剂盒	上海宏锦、上海申友
与梅毒螺旋体检测相关的试剂盒	上海万兴、爱德生物/北京蓝十字、北京耀华、华美生物、北京和新康、艾康、上海科华、吉比爱、丽珠试剂、北京金豪、北京万泰、厦门新创、中山生物、东瓯生物、北京金伟凯、北京现代高达、沈阳百奥、兰州生物制品所、上海荣盛
与人类免疫缺陷病毒检测相关的试剂盒	厦门新创、上海科华、成都生物制品所、中山生物、吉比爱、北京优耐特、丽珠试剂、华美生物、北京万泰、北京金豪、武汉生物制品所、北京阜金焱、杭州澳亚、中检所
与沙眼衣原体检测相关的试剂盒	深圳匹基、复星实业、上海宏锦、上海万达、广州蓝星、华美生物、上海申友、厦门安普利、深圳达尔安
与幽门螺杆菌检测相关的试剂盒	协和药业、山东潍坊医药、预防医学院科技服务公司、西安联尔、北京贝尔、上海晶莹

(资料来源:来宝网,2007 年 10 月发布, <http://www.labbase.net/News/ShowNewsDetails-1-19-A1A7684946563A38.html>)

【知识拓展】

什么是锡克氏毒素？如何使用及判断结果？

锡克氏毒素是经检定合格的用于测定人体对白喉易感性的白喉毒素。