



张遵 (912) 目錄廣告并圖

生物制药

工艺学



SHENGWU ZHIYAO
GONGYIXUE

主编 魏亚娟 副主编



ISBN

978-7-312-03201-2

定价 48.00元

ISBN 978-7-312-03201-2

定价 48.00元

ISBN 978-7-312-03201-2

定价 48.00元

ISBN 978-7-312-03201-2

定价 48.00元

ISBN 978-7-312-03201-2

定价 48.00元

ISBN 978-7-312-03201-2

定价 48.00元



电子科技大学出版社

University of Electronic Science and Technology of China Press

· 成都 ·

前 言

生物制药既有着悠久历史,又包含现代科学技术的应用科学领域。生物药物包含着非常丰富的内容。从总体上看,一切由生物材料为原料或用生物学方法制造的药物都属于生物药物。因此,广义上的生物药物应包括由微生物产生的微生物药物、由动植物组织提取和加工得到的生化药物、由微生物免疫技术生产的疫苗与抗体、由基因工程菌产生的基因工程药物、由微生物细胞或生物酶进行生物转化而得到的生物转化药物,以及由动植物组织细胞培养后制得的药物等。传统的中药、草药从本质上属于生物药物,但由于其发展历史悠久,已成为独立的中药制药体系,一般不将其纳入生物药物的范围。

2001年,人类基因组测序的完成,标志着人类对自身的认识达到了新的水平,对疾病本质的认识达到了新的高度。上千个与疾病相关的基因已经被定位,近百个疾病基因已被克隆,这将为新药研究、设计提供新依据。因此,生物制药将是21世纪最活跃和最具有魅力的领域之一。

生物制药属于新兴的高科技行业,近年来发展非常迅速。与此相适应,生物制药技术人才培养发展同样十分迅速,特别是面向生物制药生产一线的生物制药应用型的高校人才的培养更是日新月异,培养规模不断发展壮大。但在生物制药技术及相关专业的高校教材建设方面,还依然相对落后。《生物制药工艺学》是生物制药技术专业的核心专业课程,本教材是在全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室的组织下,为培养21世纪药学类人才而设计和编写的,希望能为我国高校生物制药技术及相关专业的发展提供些许帮助。感谢关心和支持本教材编写、出版的所有专家和编辑同志。

生物制药技术领域所涉及的知识广且新,这给该书的编写带来了不少困难。由于编者水平所限,更兼时间仓促,谬误之处在所难免,请批评指正。

编 者

目 录

第 1 章 概论	1
1.1 生物制药的起源与发展	1
1.2 生物药物概念	3
1.3 生物制药工艺的改进与创新	4
1.4 生物药物的分类	5
1.5 生物药物发展过程	10
第 2 章 生物材料的预处理及分离	13
2.1 生物材料的预处理	13
2.2 发酵液的液—固分离	18
2.3 细胞的破碎	22
第 3 章 萃取分离技术	32
3.1 溶剂萃取法	32
3.2 超临界流体萃取法	42
3.3 双水相萃取法	46
3.4 溶剂回收	52
第 4 章 凝胶层析分离技术	54
4.1 凝胶层析的基本原理及特点	54
4.2 凝胶的特性与种类	59
4.3 参数选择与操作过程	61
4.4 影响凝胶层析的因素	62
4.5 凝胶层析的应用	64
第 5 章 离子交换分离法	68
5.1 离子交换树脂的基本概念	68
5.2 离子交换树脂的分类及理化性能	70
5.3 离子交换过程的理论基础	81
5.4 离子交换过程的选择性	89



5.5	大网格离子交换树脂	93
5.6	软水和无盐水制备	95
5.7	离子交换法分离蛋白质	100
目 录		
第 6 章	沉淀分离法	104
6.1	概述	104
6.2	盐析法	104
6.3	有机溶剂沉淀法	109
6.4	其他沉淀法	111
第 7 章	膜分离法	116
7.1	分类和定义	117
7.2	表征膜性能的参数	117
7.3	分离机制	120
7.4	膜两侧溶液间的传递方程式——浓差极化—凝胶层模型	122
7.5	影响因素及应用	124
第 8 章	氨基酸类药物	134
8.1	氨基酸药物的概述	134
8.2	氨基酸的生产方法	134
8.3	谷氨酸	137
8.4	赖氨酸	144
8.5	苏氨酸	151
第 9 章	维生素及辅酶类药物	153
9.1	概述	153
9.2	维生素类药物的应用	154
9.3	重要维生素及辅酶类药物的生产	156
第 10 章	核酸与核苷类药物	166
10.1	概述	166
10.2	核酸类药物的应用	168
10.3	主要核酸类药物的生产	169
10.4	核酸与核苷类药物制备举例	176
参考文献		184

第 1 章 概 论

1.1 生物制药的起源与发展

生物药物指的是以生物材料为原料或用生物技术、方法制造的药物。人类利用生物制药已有数千年的历史。早在 3000 多年前,我国古代人民就用长霉的豆腐治疗皮肤上的疮、痈疾病。1972 年在甘肃省武威县旱滩坡东汉墓出土的大量古代医书中,记载有母曲与矾石、谷物等混合,在白蜜调和下制成丸剂,可治赤白痢等病症。此外在李时珍《本草纲目》和其他古代医书中都有用“神曲”和“红曲”治疗疮、痈、湿热泻等疾病的记载。这些都是古代劳动人民的智慧和经验的结晶,是在没有意识到微生物存在的情况下,利用微生物来治疗疾病的实例。

微生物在预防人类疾病方面也起着重要的作用。在我国宋朝的时候,当时民间医生就知道用天花病人的痘痂,研磨成粉末后吹进健康人的鼻孔里,使他们在患轻微的天花病过程中,获得了对天花病的免疫力。这比西方人应用牛痘接种进行免疫要早大约 800 年。

西方发明用接种方法预防天花的是英国的乡村医生琴纳,当时是 18 世纪,天花病流行,夺去了无数人的生命,面对大量的病人,琴纳发现挤牛奶的姑娘却没有一人生病,这是什么原因呢?琴纳经过深入的研究得知,原来姑娘们在挤奶时,手无意中接触了牛痘的浆液,牛痘病毒就从手上细小的伤口进入人体,随后虽然手上出现少数的痘疹但从此就获得了对天花病毒的免疫力。经过一系列实验后,他为一个小男孩接种了牛痘,成功地获得了预防天花的效果。这是人类用科学的方法免疫防病的开端。经过几个世纪的努力,人类已经研制出了多种疫苗,有效地控制了天花、麻疹、霍乱、鼠疫、伤寒等传染性疾病的传播。

1929 年英国的细菌学家弗莱明(Fleming)发现了青霉素,并鉴定了其产生菌为点青霉(*Penicillium notatum*),但是由于青霉素不稳定,当时没有提取到青霉素的纯品。1940 年由弗罗里(Florey)和钱恩(Chain)再次研究了青霉素,成功地提取出了青霉素的结晶,并证实了它的临床效果,从此世界上真正具有临床价值的抗生素产生了。第二次世界大战期间,战场上的伤员需要大量的抗感染药物,青霉素发酵生产的成功拯救了无数伤病员的生命,为人类治疗细菌感染性疾病开创了新的时代。

20 世纪的 40—50 年代是抗生素工业发展的黄金时代,在这 20 多年里,大批的新抗生素被发现,并在临床上得到了应用。1944 年美国的放线菌专家瓦克斯曼(Waksman)从土壤中分离出一株灰色链霉菌,并从它的发酵液中发现了链霉素。这是第一个可用于治疗结核病的抗生素。1947 年人们找到了第一个广谱抗生素氯霉素,以后又陆续发现了多黏菌素(1947)、金霉素(1948)、新霉素(1949)、制霉菌素(1950)、土霉素(1950)、红霉素(1952)、四环



素(1953)。1957年日本科学家梅泽滨夫发现了对耐药菌有效的卡那霉素。

在20世纪40年代发现的新抗生素中有14种在临床上得到了应用。在50年代发现的新抗生素中有20种在临床上得到了应用。1957年以后相继发现了吉他霉素、麦迪霉素、螺旋霉素等,也均已用于临床治疗。1957年发现了安莎类抗生素的第一个成员利福霉素,对其分子结构进行化学改造获得利福平等一系列衍生物,是治疗肺结核、麻风病的有效药物。1963年从小单孢菌中发现了毒性较低的庆大霉素,1967年美国礼来公司发现了对铜绿假单孢菌作用强且毒性低的妥布霉素。

20世纪50年代以来,维生素、氨基酸、酶制剂等生物药物的发酵生产得到了迅速的发展。用棉阿舒囊霉深层发酵生产维生素 B_2 (核黄素)的发酵工艺进一步完善,产量显著提高。用丙酸菌直接发酵生产维生素 B_{12} 的生产工艺也建立起来。自从谷氨酸发酵生产首先在日本取得成功,各种氨基酸产生菌的筛选和生物合成机制的研究日益深入,到目前为止,赖氨酸、苏氨酸等18种氨基酸均可用微生物发酵法进行生产,并实现了发酵生产的规模化、自动化。

酶制剂的工业生产首先起始于 α -淀粉酶,其后葡萄糖异构酶、蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、转化酶、凝乳酶、脂肪酶、青霉素酰胺酶、天冬酰胺酶等品种陆续实现工业化的发酵生产。此后,有机酸、肌苷、肌苷酸、ATP、辅酶A等重要医药品的发酵生产技术日益成熟,满足了市场的需求。

20世纪60年代以来,一些新的抗肿瘤抗生素、抗病毒抗生素、抗虫抗生素和农牧业用抗生素等被开发出来。如抗肿瘤抗生素如丝裂霉素、柔红霉素、博莱霉素;抗病毒抗生素如阿糖腺苷、偏端霉素A。还有畜牧业上用的抗虫抗生素如盐霉素、莫能菌素、阿维菌素和农业上用的抗菌抗生素如春雷霉素、有效霉素、井冈霉素等。

20世纪70年代,由我国研究成功的维生素C“二步发酵法”处于国际领先地位,其发酵技术已转让国外。此外,我国在甾体激素药物的微生物转化、有机溶剂的发酵生产方面都取得了长足的发展。

计算机技术在生物制药工业中的应用、新型传感器的研究及其在生物制药中的应用,都为生物制药工业的发展带来了巨大的变化。与此同时,生物制药工艺与设备的研究也得到了迅速的发展。

中华人民共和国成立前,我国几乎没有真正的生物制药企业。1949年后,我国的生物制药工业得到了迅速的发展。1953年我国的第一家青霉素生产厂——上海第三制药厂建成投产。1958年我国最大的抗生素制药企业——华北制药厂在石家庄建成投产。随后,全国各省都建立了抗生素制药厂,其产量不仅满足了国内医药市场的需要,并大量出口国外。目前,我国已成为世界上最大的抗生素出口国。

20世纪70年代以后,生物技术迅速发展,形成一个以基因工程为主导、发酵工程为中心的包括酶工程、细胞工程的现代生物技术体系。主要的生物技术包括:重组DNA技术、原生质体制备与原生质体融合技术、突变生物合成、组合生物合成、选择性生物催化合成、代谢途径工程、淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体、组织培养技术、基因治疗等。这些新的生物技术在生物制药领域得到了应用和发展。



利用 DNA 体外重组技术构建的基因工程菌陆续投入发酵生产,拓宽了生物制药工业的领域;利用 DNA 重组技术成功地研制出胰岛素、干扰素、白细胞介素、生长激素、红细胞生成素、肿瘤坏死因子等各种人体活性蛋白多肽和因子,用于治疗多种疑难疾病;运用突变生物合成和组合生物合成技术研制出了结构新颖的微生物药物;利用生物转化技术选择性合成手性药物中的各种复杂的立体异构体,解决了有机化学方法很难合成,甚至是不能进行的不对称合成;应用细胞融合技术研制成功的各种单克隆抗体,在临床疾病的诊断、治疗和恶性肿瘤的治疗等方面得到了应用;运用转基因动物和转基因植物成功研制出新的生产体系,用于生产安全、方便、廉价的基因工程药物。

基因工程技术也促进了生物制药中新菌种的研究和开发,极大地提高了菌种的生产能力。礼来公司与牛津大学合作构建了生产头孢菌素 C 的基因工程菌,通过增加另一套扩环酶(催化青霉素 N 转化为脱乙酰氧头孢菌素 C)基因,使头孢菌素 C 的产量提高 15%,并已用于大规模生产了。Isogai 等人将含有茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)的 CPC 酰基转移酶(CA)基因和假单孢菌的 D-氨基酸氧化酶(DAO)基因的重组质粒转化到头孢菌素 C 产生菌中,此基因工程菌可直接产生半合成头孢菌素的起始原料 7-氨基头孢烯酸(7-ACA)。俄罗斯和德国科学工作者根据维生素 B₂(核黄素)合成遗传学研究结果构建出的芽孢杆菌工程菌株,维生素 B₂产量达 10 克/升以上;Anderson 等构建的基因工程菌,可以将 D-葡萄糖经一步发酵生成 2-酮基-L-古龙酸(2-KGA,维生素 C 的前体),转化率达 47.7%。

现在的生物制药工业已经不是单纯的由天然的微生物进行发酵的传统微生物制药,而是包括天然微生物、人工构建的“基因工程菌”、动植物组织细胞的培养和提取、微生物或生物酶催化的生物转化、微生物疫苗等多种类的制药工业体系。

20 世纪 80 年代后,我国的基因工程技术迅速发展,带动了生物制药工业向新的领域发展。到 1998 年,我国已生产的基因工程药物有 14 种,全国从事现代生物技术制药的企业有 200 多家。

1.2 生物药物概念

生物药物是指利用生物体、生物组织、体液或其代谢产物(初级代谢产物和次级代谢产物),综合应用化学、生物化学、生物学、医学、药学、工程学等学科的原理与方法加工制成的一类用于疾病的预防、治疗和诊断的物质。

生化药品与生物制品在生物药物领域使用得也十分广泛,二者的概念与生物药品不同,不能混淆:生化药品,在 2005 年版中国药典中,归类入第二部,主要指的是以天然动物及其组织为原料,通过分离纯化制备的生物药物,历史上曾通俗地称之为脏器制药;而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。人用生物制品包括细胞类疫苗、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。生物制品在 2005 年版中国药典中归类入第三部。生化药品与生物制品同属于生物药物。现代



的生物药物除了生化药品与生物制品外,还包括其他一切以生物体、组织或酶为原材料或手段制备的医药产品。因此,生物药物的内涵是相当丰富的。

1.3 生物制药工艺的改进与创新

青霉素发酵生产的初期采用表面培养法,生产水平很低,为了满足市场的需求,必须改进方法和设备,进行大规模生产。1941年成功地研究深层培养法并取得一定的成果,制造出带有搅拌和通风装置的发酵罐,采用培养基和制药设备的灭菌技术、空气的净化除菌工艺、无菌接种技术,制定和完善了发酵过程中pH、温度、营养物质浓度等参数的监控系统,逐渐发展起完整的液体深层发酵技术,使得需氧菌的发酵生产从此走上了大规模工业化生产途径。这是生物制药工业史上的重大变革和成就,也为后来其他生物药物的工业化发酵生产奠定了基础。

生物制药工业在几十年的历史发展过程中,生产工艺不断改进,技术不断创新。主要体现在以下几个方面。

1.3.1 微生物培养技术的发展

发酵生产由最初的表面培养法,发展到深层培养法,生产能力得到了极大的提高。随着发酵品种的增加,需要不同的培养方式,因而产生了补料发酵、连续发酵、高密度发酵等新的培养方式。补料分批发酵,可以延长发酵周期,显著提高了发酵的水平;连续发酵有利于生产的连续化、自动化;高密度发酵产量高,常用于基因工程菌的发酵。

1.3.2 发酵控制技术的发展

通气搅拌发酵技术始于20世纪40年代,其技术特征为,成功地建立起深层通气进行微生物发酵的一整套技术,有效地控制了微生物有氧发酵的通气量、温度、pH和营养物质的供给。通气搅拌发酵技术的建立是现代发酵工业的开端。通气搅拌发酵技术的建立,不仅促进了抗生素发酵工业的兴起,而且可以利用液体深层通气培养技术对各种有机酸、酶制剂、维生素、激素等产品进行大规模生产。

代谢调控发酵技术始于20世纪60年代,其技术特征为,以生物化学和遗传学为基础,研究代谢产物的生物合成途径和代谢调节机制,控制微生物的代谢途径,使之进行最合理的代谢,在人工控制的条件下,选择性地大量积累人们所需要的代谢产物。代谢调控发酵技术的建立形成了一个较完整的、利用微生物发酵的工业化生产体系。通过对微生物进行人工诱变,改变微生物代谢途径,最大限度地积累产物。

随着人们对发酵过程认识的不断深入,同时也伴随着其他领域的科学技术的不断发展,生物制药工作团队控制发酵过程的能力不断加强。各种发酵参数(如温度、搅拌转数、通气量、罐压等)从最初的人工测量与控制,发展到使用自动化仪表进行测量与控制,再发展到目前的计算机控制。这些进步都极大地提高了发酵过程控制的水平,从而显著提高了发酵水平。



发酵控制水平的提高得益于计算机技术的发展、测量仪器制造技术的发展,特别是高性能计算机的普及和传感器制造技术的发展,为发酵过程的计算机控制开创了新的局面。例如,可耐高温的 pH 电极、溶氧电极的成功研发,实现了在线测定 pH 和溶解氧浓度;使用二氧化碳分析仪和氧分析仪,可以对发酵排气中的二氧化碳含量和氧含量进行在线测定,从而可以随时计算出发酵过程的摄氧率、呼吸熵等参数,为发酵过程的控制提供了更多、可利用的参数。

近年来,采用气相色谱—质谱联用技术对发酵尾气进行在线测定,从而有助于分析发酵过程和控制发酵过程。如用此技术在阿维菌素的发酵中测定的数据更为全面和精确,由此计算的间接参数更为合理;计算出的呼吸熵可以作为葡萄糖浓度过低的预警,参与补料速率控制;同时还找到了临界通气量的数值。

1.3.3 生物反应器制造技术的发展

在现代生物技术发展中,高效率低能耗生物反应器的成功研制起了重要的作用,它的高效率取决于它的自动化程度和精细控制系统。传统的混合式发酵罐是发酵工业中最常用的生物反应器,大容量的发酵罐可以提高发酵生产效率,降低生产成本。但是大容量的发酵罐制造难度大,工艺要求高。随着我国机械制造技术的进步,发酵罐的制造技术也不断提高。过去只能制造 50~100m³的发酵罐,现在已经能够制造 200m³甚至更大容量的发酵罐。此外,发酵罐的大型化、多样化、连续化、自动化方面也得到了极大的发展,工艺控制精度的提高,使得对发酵过程的控制更为合理,进一步提高了菌种的生产能力。

1.3.4 分离纯化技术的发展

在生物药物生产中,提取和精制是最终获得商业产品的重要环节,也是生物制药产业核心技术之一,分离纯化技术的水平与生物药物的质量和收率有着密切的关系。从分离纯化机制上划分,生物制药行业现行的分离纯化技术主要有五大类:基于溶解度差异的分离纯化技术、基于分子大小差异的分离纯化技术、基于选择性吸附差异的分离纯化技术、基于电荷不同的分离技术、基于对配体亲和力差异的分离技术。

20 世纪 70 年代之后,随着生物技术的高速发展,新的后处理技术不断涌现,在原有基础上,多级连续萃取、双水相萃取等新技术不断发展;絮凝分离技术采用絮凝剂,使细胞或溶解的大分子聚结成较大的颗粒,加大沉降速率易于过滤,强化菌体分离;膜分离新技术发展迅速,高强度、抗污染的各种膜不断出现,其中又以超滤膜发展较快,可根据膜孔度将分子量大小不同的分子进行分离,研发并运用了平板、板框、中空纤维和螺旋型等多种类型的成套超滤器。

1.4 生物药物的分类

生物制药工业的产品种类繁多,包括的品种极其广泛。通常是按药物的化学本质和化学特性、来源和制造方法、生理功能和临床应用以及将三者结合进行综合分类。现代生物药物可分为四大类。



1.4.1 基因药物

基因药物(gene medicine)是以基因作为治疗的物质基础,包括基因治疗用的重组目的DNA片段、重组疫苗、反义药物和核酶等。基因治疗除用于遗传病治疗外,已扩展到用于治疗肿瘤、艾滋病、囊性纤维变性、糖尿病和心血管疾病等。

反义药物(anti-sense medicine)是以人工合成的十至几十个反义寡核苷酸序列与模板DNA或mRNA互补形成稳定的双链结构,抑制靶基因的转录和mRNA的翻译,从而起到抗肿瘤和抗病毒的作用。反义药物除用于抗肿瘤、抗病毒治疗外,还用于心血管疾病、代谢障碍与免疫系统及细胞黏附系统的疾病治疗。

1.4.2 基因工程药物

利用基因工程和蛋白质工程技术制造的重组活性物质,如治疗性多肽、蛋白质、激素、酶、抗体、可溶性受体等。

1.4.2.1 细胞因子干扰素类

有 α -干扰素(α_1 b、 α_2 a、 α_2 b)、 β -干扰素和 γ -干扰素等。

1.4.2.2 白介素类和肿瘤坏死因子等细胞因子类

临床应用的有白介素-2(IL-2)和突变型白介素-2(Ser¹²⁵-IL-2)。IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11和IL-12等正在研究开发中。肿瘤坏死因子类主要包括TNF- α 和TNF- α 受体等。

1.4.2.3 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(PDFD)、转化生长因子(TGF- α 和TGF- β)、神经生长因子(NGF)及各种神经营养因子等。它们的主要功能是促进细胞生长、组织再生和创伤治疗等。

1.4.2.4 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。它们的主要功能是促进造血系统,增加白细胞、红细胞和血小板等。

1.4.2.5 重组多肽与蛋白质类激素类

主要品种有重组人胰岛素(rhInsulin)、重组人生长激素(rhGH)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和绒毛膜促性腺激素(HCG)、重组人白蛋白和重组人血红蛋白等。

1.4.2.6 重组疫苗与单抗制品

重组疫苗有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疫苗、流感疫苗、痢疾疫苗和肿瘤疫苗等。

单抗制品有抗HER2/neu抗体,用于治疗乳腺癌;抗F单克隆抗体,用于治疗呼吸道病毒感染;抗TNF- α 单克隆抗体,用于治疗风湿性关节炎;抗EGFR(Her-1)单克隆抗体,用于治疗头颈癌等。



1.4.2.7 心血管病治疗剂与酶制剂

主要品种有Ⅷ因子、水蛭素、tpA、rtpA、尿激酶、链激酶、葡激酶、天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、葡萄糖脑苷酶及 DNase 等。此类药品主要用于心血管疾病和抗肿瘤治疗。

1.4.3 天然生物药物

天然生物药物(natural biological medicine):主要是指来自自然界中动物、植物或微生物的药物。相对分子质量一般较大,组成结构常较复杂,生物活性受到多种因素的影响。通常比化学药物更合理和更有效,毒性较低、安全性较高、副作用较小。

天然生物药物是新型生物药物的先导物,通过合理药物设计,可以创造疗效更高、作用更专一、更易为机体所接受、副作用与不良反应更小的新药。

1.4.3.1 微生物药物

微生物药物(microbial medicine)是一类特异的天然有机化合物,包括微生物的初级代谢产物(primary metabolite)、次级代谢产物(secondary metabolite)和微生物结构物质,还包括借助微生物转化(microbial transformation)产生的用化学方法难以合成的药物或中间体。

1. 抗生素类药物(antibiotic medicine)

抗生素(antibiotics)是生物(动物、植物或微生物)在其生命活动中产生的,能够杀灭或抑制其他微生物的一类物质及其衍生物,用于治疗敏感微生物(常为细菌或真菌)所致的感染,具有抗感染和抗肿瘤的作用。此外,抗生素还有杀虫、除草及抑制某些酶类的作用。

2. 维生素类药物(vitamin medicine)

维生素是维持动物体内脂肪、蛋白质和糖类等正常代谢和动物体的正常生长发育所必需的一类有机化合物。在化学结构上和生理作用上各不相同。维生素不仅用于治疗维生素缺乏症,而且广泛地用作医疗辅助用药及动物的营养性添加剂。现在已知的维生素有三四十种,大都是根据它们的缺乏症而发现的。

3. 氨基酸类药物(amino acid medicine)

用微生物野生菌株发酵生产的氨基酸有4种:L-谷氨酸、L-缬氨酸、L-丙氨酸、DL-丙氨酸;采用前体发酵的氨基酸有5种:L-异亮氨酸、L-色氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-苯丙氨酸。

4. 核苷酸类药物(nucleic acid medicine; nucleotide medicine)

由某些动物、微生物的细胞中提取出的核酸(包括核苷酸和脱氧核苷酸),或者用人工合成法制备的具有核酸结构(包括核苷酸和脱氧核苷酸结构)同时又具有一定药理作用的物质,称为核酸药物或核酸类生化药物。广义的核酸药物可包括核苷酸药物、核苷药物及含有不同碱基化合物的药物。

5. 酶与辅酶类药物(enzyme and coenzyme medicine)

此类药物包括:①心血管疾病治疗酶,如辅酶 Q、链激酶、双链酶与葡激酶等;②抗肿瘤酶,如 L-天冬酰胺酶、核糖核酸酶等;③辅酶类药物,如辅酶 I (NAD)、辅酶 II (NADP)、辅酶 A(CoA)等。



6. 酶抑制剂类药物(enzyme inhibitor medicine)

由微生物来源的酶抑制剂用于抗肿瘤的有亮氨酸氨肽酶抑制剂——苯丁亮氨酸(bestatin); β -内酰胺酶抑制剂——克拉维酸(Clavulanic acid)与羟氨苄青霉素、羟噻吩青霉素分别组成安灭菌与泰灭菌,都能保持对产青霉素酶的耐药菌有效。

7. 免疫调节剂类药物(immunomodulating agents medicine)

用来增强及调节免疫功能的药物。该类药物对治疗免疫功能低下、某些继发性免疫缺陷病及恶性肿瘤,均有一定疗效。大多是生物制品,如卡介苗(BCG)、内毒素等;少数是一些人工合成的化学药物如左旋咪唑(levamisole)和梯洛龙(tilorone)等。

8. 受体拮抗剂类药物(receptor antagonist medicine)

受体拮抗剂是根据受体配体结合原理来筛选得到的特异性强、毒性小的生物活性物质。1985年,从洋葱曲霉中得到了第一个非肽的缩胆囊素(CCK)受体拮抗剂(asperlicin),它对胰腺、肠和胆囊上受体的亲和力比丙谷胺(proglumide)强约300倍。此后又合成了活性更强的MR₃₂₉,这类物质有可能被用做治疗与CCK有关的胃肠道系统紊乱疾病。

除此之外,还从微生物的代谢产物中发现了为数众多的具有抗血栓作用的受体拮抗剂、与降血压作用有关的血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂、内皮素受体拮抗剂、钙通道拮抗剂、具有抗炎作用的受体拮抗剂及作用于神经系统的受体拮抗剂等。

1.4.3.2 天然生化药物

天然生化药物(natural biochemical medicine)是指从生物体(动物、植物和微生物)中获得的天然存在的生化活性物质,其有效成分和化学本质多数比较清楚,通常按其化学本质和药理作用分类命名。主要分为以下几种。

1. 氨基酸类药物

氨基酸类药物分为个别氨基酸制剂和复方氨基酸制剂两类。个别氨基酸制剂如胱氨酸用于抗过敏、肝炎辅助治疗和白细胞减少症;复方氨基酸制剂由多种结晶氨基酸根据治疗需要按比例配制而成,如有7种氨基酸复方、13种氨基酸复方等。

2. 多肽及蛋白质类药物

多肽的相对分子质量一般较小,多数无特定空间构象。但某些多肽也有一定构象,只是其构象的坚固性远不如蛋白质,其特点是构象的浮动性很大,有时甚至在几种构象中进行摆动,或在发挥某种生物功能时才呈现某种构象。

3. 酶与辅酶类药物

现已用于疾病的诊断与治疗的药用酶制剂有:①助消化酶类,如胃凝乳酶、纤维素酶和麦芽淀粉酶等;②消炎酶类,如胶原蛋白酶用于治疗褥疮和溃疡,木瓜凝乳蛋白酶用于治疗椎间盘突出症;③心脑血管疾病治疗酶类,防治血栓的酶制剂有尿激酶、链激酶、蚓激酶、蛇毒降纤酶;④抗肿瘤酶类,如L-天冬酰胺酶用于治疗白血病和淋巴瘤;⑤其他治疗用酶,如PEG-腺苷脱氨酶(PEG-adenase bovine)用于治疗严重的综合免疫缺陷症;青霉素酶可治疗青霉素过敏;⑥辅酶类药物,多种酶的辅酶或辅基成分具有医疗用途,如辅酶Ⅰ(NAD)、辅酶Ⅱ(NADP)、黄素单核苷酸(FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、辅酶Q₁₀、辅酶A等;已



广泛应用于肝病和冠心病的治疗。

4. 核酸及其降解物和衍生物类药物

包括核酸、多聚核苷酸和核苷、核苷酸及其衍生物等。

5. 多糖类药物

多糖类药物(polysaccharide medicine)在抗凝、降血脂、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫功能和抗衰老等方面具有较强的药理作用。

6. 脂类药物

脂类药物(lipid medicine):包括许多非水溶性的、能溶于有机溶剂的小分子生理活性物质,主要有:①磷脂类;②多价不饱和脂肪酸和前列腺素;③胆酸类;④固醇类;⑤卞啉类等。

7. 细胞生长因子与组织制剂

细胞生长因子(cell growth factor):这类物质大多是蛋白质或多肽。许多细胞生长因子在靶细胞上有特异性受体。它们是一类分泌性可溶性介质,仅微量就有明显的生物活性。细胞生长因子有细胞生长刺激因子与细胞生长抑制因子两大类,如成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板生长因子(PDGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、促红细胞生成素(EPO)以及胰岛素样生长因子(IGF)等。

1.4.3.3 海洋生物药物

海洋生物药物(pharmaceuticals of marine biological origin)是指从海洋生物分离纯化的活性物质与利用海洋生物技术制造的生物药物。按照其化学结构类型分类主要有:多糖类、聚醚类、大环内酯类、萜类、生物碱、核苷、多肽、蛋白质、酶、甾醇类、苷类和饱和脂肪酸等。已获得的新化合物以甾醇最多,其次是萜类、生物碱也有一定的比例。

1.4.4 生物制品

生物制品(biological; biological preparation; biological product; bioproduct):一般指的是用微生物(包括细菌、噬菌体、立克次体、病毒等)、微生物代谢产物、动物毒素、人或动物的血液或组织等加工制成的用来预防、治疗和诊断特定传染病或其他有关疾病的免疫制剂。主要指疫苗、疫苗、毒素、应变原与血液制品等。我国《新生物制品审批办法》对生物制品的定义如下:生物制品是应用普通的或以基因工程、细胞工程、蛋白质工程、发酵工程等生物技术获得的微生物、细胞及各种动物和人源的组织和液体等生物材料制备的,用于人类疾病预防、治疗和诊断的药品。据此,在我国除了合成或部分合成的生物药物外,其余三类生物药物基本上都归属于新生物制品。目前,我国人用生物制品包括细菌类疫苗(含类毒素)、病毒类疫苗、抗毒素及免疫血清、血液制品、细胞因子、体内及体外诊断制品以及其他活性制剂(包括毒素、抗原、变态反应原、单克隆抗体、重组DNA产品、抗原-抗体复合物、免疫调节剂、微生态制剂等)。包括预防用生物制品、治疗用生物制品和诊断用生物制品。

随着生物技术的迅速发展,生物制品在我国已获得极大发展,重组药物、基因药物等生物技术药物以及天然生物药物的多组分制品均属于生物制品范畴,在新药研究与申报时均按《新生物制品审批办法》要求进行管理。



医学生物制品按制造的原材料不同,其中预防用制品可分为:菌苗(如卡介苗、霍乱菌苗、百日咳菌苗、鼠疫菌苗等)、疫苗(如乙肝疫苗、流感疫苗、乙型脑炎疫苗、狂犬疫苗、痘苗、斑疹伤寒疫苗)及类毒素(如白喉类毒素、破伤风类毒素);治疗用制品有特异性治疗用品(如狂犬病免疫球蛋白)与非特异性治疗用品(如白蛋白);诊断用制品主要指免疫诊断用品,如结核菌素、锡克试验毒素及多种诊断用单克隆抗体等。

随着生物科学的迅猛发展,生物制品在品种上从原来的疫苗发展到菌苗和类毒素等,在性质上从减毒活苗发展到灭活疫苗和死菌苗,并由主动免疫制剂发展到抗毒素等被动免疫制剂。在用途上从预防制剂发展到治疗和诊断制剂。例如对于严重急性呼吸系统综合征的抗 SARS 冠状病毒的免疫预防研究就有疫苗(主动性免疫预防)和中和抗体(被动性免疫预防)两个途径,前者如 SARS 冠状病毒的全病毒灭活疫苗、SARS 冠状病毒基因工程疫苗、SARS 冠状病毒的多肽合成疫苗、SARS 冠状病毒的核酸疫苗;后者如大动物抗血清、鼠源单克隆抗体和人源化中和性单克隆抗体等。

血液制品主要有:①人血液成分制品,如红细胞制剂、白细胞浓缩液、血小板制剂、新鲜冰冻血浆;②血浆各种成分的综合利用,如转运蛋白(白蛋白、转铁蛋白等);③免疫球蛋白;④各种凝血因子如纤维蛋白原,凝血因子Ⅷ、Ⅸ;⑤补体系统蛋白;⑥蛋白酶抑制物(α_1 -抗胰蛋白酶、抗凝血酶Ⅲ)等。另外,人造血液代用品、特异性免疫球蛋白制品也是血液制品的发展热点。

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研究各种诊断测试试剂。在这个领域中,方法学的发展将会导致产生更多的高效、特异优良试剂,各种单克隆抗体诊断试剂的大量上市,以及特异诊断病种的试剂盒和基因芯片也已广泛进入临床应用,从而促使临床诊断试剂朝着更快速、方便、准确、可靠和更加标准化的方向发展。

1.5 生物药物发展过程

人类利用生物药物治疗疾病有着悠久的历史,古代的中国在此方面创造了光辉的成就。我国应用生物材料作为治疗药物的最早者为神农,他开创了用天然物质治疗疾病的先例,如:用鳝(包括甲状腺的头部肌肉)治疗甲状腺肿大,用紫河车(胎盘)作强壮剂,用鸡内金止遗尿及消食健胃。早在 10 世纪,我国民间就有通过使用天花患者衣服来预防天花的实践,其原理是用降低了毒力的天花病毒接种到人体上,引起轻型感染,起到预防天花的目的。最值得一提的是用秋石治病。秋石是从男性尿中沉淀出的物质,这是最早从尿中分离类固醇激素的方法。其原理与近代 Windaus 等在 20 世纪 30 年代创立的方法颇为相似。我国的用法出自 11 世纪沈括所著的《沈存中良方》中。明代李时珍的《本草纲目》记载药物 1892 种,除植物药外,有动物药 444 种(其中鱼类 63 种、兽类 123 种、鸟类 77 种、蛭类 45 种、昆虫百余种)。书中详述了各种药物的用法、功能、主治等。可见,人类用生物材料及其分离产品作为生理功能调节剂应属中国人始创。

早期的生物药物多数来自动植物组织,有效成分不明确。随着生物化学、生理学等学科



的发展,对生物体内各种生物物质作用的认识和了解,各种必需氨基酸、多种维生素及纯化的胰岛素、甲状腺素和必需脂肪酸等开始用于临床治疗和保健。20世纪40年代以后开始了抗生素的工业化生产,相继发现和提纯了肾上腺皮质激素和脑垂体激素;50年代起开始应用发酵法生产氨基酸类药物;60年代以后,从生物体分离、纯化酶制剂的技术日趋成熟,酶类药物很快获得应用,尿激酶、链激酶、溶菌酶、门冬酰胺酶、激肽释放酶等已成为具有独特疗效的常规药物;80年代仅生化药品就有350多种;到90年代初,已有生化药品500多种,还有100多种临床诊断试剂。

自1982年人胰岛素成为用DNA重组技术生产的第一个生物医药产品以来,以基因重组技术开发研究的新药数目一直居首位。迄今已上市的新生物药物有人胰岛素(1982)、人生长素(1987)、 α -干扰素(1987)、乙肝疫苗(1987)、人白介素-2(1989)、人组织纤溶酶原激活剂(1988)、超氧化物歧化酶(1990)、促红细胞生成素(1988)、集落细胞刺激因子(1990)以及尿激酶、降钙素、脑啡肽等。另外,还有上百种单克隆抗体已投入应用。单克隆抗体OKT-3是第一个用作治疗药物的单克隆抗体制剂,用于抗肾脏移植的急性排斥作用。诊断用酶已有80多种,经常使用的大概有20种。此外,应用酶工程、细胞工程和基因工程等生产抗生素、氨基酸和植物次级代谢产物也步入产业化阶段。

20世纪以来,随着病毒培养技术的发展,疫苗种类日益增加,制造工艺日新月异。30年代中期建立了小鼠和鸡胚培养病毒的方法,从而用小鼠脑组织或鸡胚制成黄热病、流感、乙型脑炎、斑疹伤寒等疫苗。50年代,在离体细胞培养物中繁殖病毒的技术取得突破,从而研制成功麻疹、腮腺炎等新疫苗。80年代后期,应用基因工程技术研制成功乙肝疫苗、狂犬病疫苗、口蹄疫疫苗和AIDS疫苗。预计基因工程疫苗的品种将会迅速增多。同时各种免疫诊断制品和治疗用生物制品也会迅速发展,如各种单克隆抗体诊断试剂、甲肝诊断试剂、乙肝诊断试剂、丙肝诊断试剂、风疹病毒诊断试剂、水痘病毒诊断试剂等都已相继投放市场。

按照制品的纯度,工艺特点和临床疗效特征,生物药物的发展大致分三个阶段。第一阶段的特点是低纯度,低产量。在这一阶段,抗生素生产因菌种生产能力低,生产技术落后,所以产品的效价低,产量难以满足市场需求。生化药品大都是利用生物材料加工制成的含有某些天然活性物质混合成分的粗制剂,如脑垂体后叶制剂、肾上腺提取物、眼制剂、混合血清等。第二阶段是根据生物化学和免疫学原理,应用近代生化分离技术从生物体制取的具有针对性治疗作用的特异生化成分的生物药物,如猪、牛胰岛素、前列腺素E、尿激酶、肝素钠、人丙种球蛋白、狂犬病免疫球蛋白等。抗生素生产也随着产生菌生产能力的提高、发酵工艺和分离技术的改进及半合成技术的发展,大大提高了疗效,降低了成本,扩大了产量,极大地满足了市场的需求。第三阶段是应用生物技术生产的天然生物活性物质以及通过蛋白质工程原理设计制造的具有比天然物质更高活性的类似物或与天然品结构不同的全新的药理活性成分的生物药物,如用PEG修饰的腺苷脱氨酶(PEG-ADA)、抗高血压三肽Capto-proil(甲硫-丙脯酸)与口服脑啡肽等。

世界各国纷纷把现代生物技术研究开发的目标瞄准医药、医疗和特殊化学品领域的产业化。生物制药工业正在发生着巨大的变革。为了争夺生物制药工业市场,各国正在大力发展以生物技术制药产业为主的“生物技术产业群”。在生物技术制药方面美国一直稳居榜



首,2000年产值超过200亿美元,已有723种生物技术药物正在接受FDA审批(包括1~3期临床和FDA评估);有200个产品已到最后批准阶段,有80个新品种即将上市,还有700多种处于不同研究阶段。由此预测今后10年,制药工业将更广泛地应用现代生物技术,促进产品结构更新换代和发展。在肿瘤防治、老年保健、免疫性疾病、心血管疾病和人口控制等疑难病的防治中,生物药物将起到独特作用,为保障人类健康做出更大贡献。生物制药工业也必将得到蓬勃发展。

第2章 生物材料的预处理及分离

2.1 生物材料的预处理

动物、植物、微生物的组织、器官、细胞及代谢产物是生物活性物质的主要来源。生物活性物质的存在部位有“胞内”与“胞外”两种形式。其中“胞外”物质是由细胞产生，再释放出来的。但是，不管目的产物存在于“胞内”还是“胞外”，通常浓度是很低的，而杂质的含量却非常高，并且，生理活性越高的成分，其含量往往是越低的。随着基因工程技术的不断发展，应用基因克隆表达的方法可用微生物或动、植物细胞生产多种经典方法难以获得的蛋白质或多肽类药物。针对产物的不同状态需选择不同的预处理方式，以减少各种杂质对后续分离纯化工艺的干扰，同时还要注意防止细胞内各种酶对产物的水解破坏作用。

常规的处理方法是首先将细胞、菌体以及其他固体悬浮颗粒与可溶性组分分离。对于胞内产物，应先经细胞破碎，使生物活性物质转移到液相，再经固液分离，除去细胞碎片等固体杂质。对于较大的细胞及悬浮颗粒，可以采用常规的过滤或离心方法，但是较小的细胞或悬浮粒子，必须先将发酵液预处理，以利于后序分离、纯化过程的顺利进行。

2.1.1 预处理方法的确定

2.1.1.1 生物活性物质的存在方式及特点

生物活性物质的存在方式与其生物功能的关系十分密切。一般，可以根据生物活性物质的生理功能推断其存在的主要部位和分布方式。对于常常是以无活性的酶原形式存在的酶时，提取时需要预激活。目前常采用的方式有两种，一种是提取前先通过预处理加入活化剂；另一种方式是先以酶原的形式初步提纯，然后加入活化剂等活化，再通过精制纯化得到有活性的酶类产品。

生物材料的化学组成十分复杂，生物活性物质的含量存在种属差异。同种生物在细胞与细胞之间、组织与组织之间，由于细胞的类型、年龄、分化程度的不同，活性物质的组成也不同，尤其是色素类物质和某些生理活性成分的种类与组成在不同生物间的差别更大。

由于生物活性物质与杂质的理化性质如溶解度、相对分子质量等电点等都十分接近，所以分离、纯化会比较困难。尤其是在纯化的过程中生物材料中的有效成分的生理活性处于不断变化中，可能被材料中自身的代谢产物所破坏，或被微生物活动所分解，还可能在制备过程中受到酸、碱、盐、重金属离子、机械搅拌、温度甚至空气和光线的作用而改变其生物活性，因此，整个制造过程中都要把保持目的物的活性放在首位。