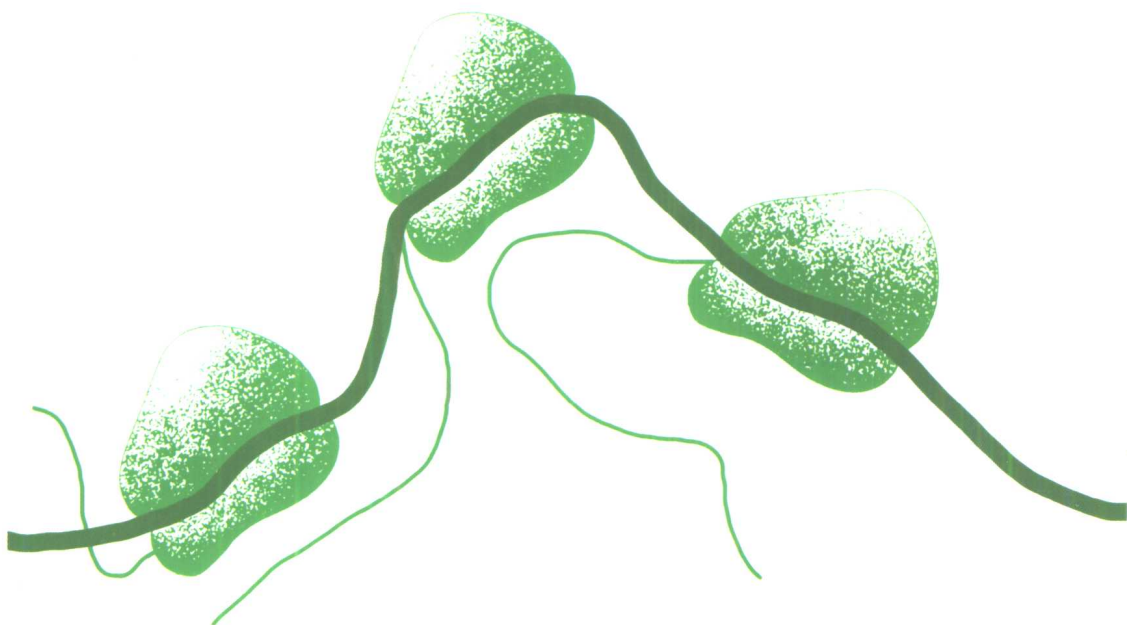




面向 21 世纪 课程 教材
Textbook Series for 21st Century

生物技术制药

熊宗贵 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

生物技术制药

熊宗贵 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内容提要

本教材为教育部“高等医药院校面向 21 世纪教学内容和课程体系改革”项目中“生物技术制药六年制专业课程体系和教学内容改革研究和实践”课题研究成果。是教育部推荐的“面向 21 世纪课程教材”。

现代生物技术是当前优先发展的高技术领域之一,其中尤以医药生物技术分支发展最快。本书是以医药生物技术为基础,围绕生物药物的制造方法进行编写的,包括基因工程制药、抗体制药、动植物细胞制药和酶工程制药等 8 章。书中还阐述了天然生物药物的来源以及如何利用现代生物技术对传统医药工业进行改造。

本书可作为医药或相关院校的本科生物技术专业或相关专业的教材或参考书,并可供从事生物技术制药的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术制药/熊宗贵主编;于荣敏等编. —北京:高等教育出版社,1999.8 (2000 重印)
面向 21 世纪课程教材
ISBN 7-04-007317-X

I. 生… II. ①熊… ②于… III. 药物:生物制品—制造—高等学校:医药院校—教材 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 24163 号

生物技术制药
熊宗贵 主编

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号
电 话 010-64054588
网 址 <http://www.hep.edu.cn>

邮政编码 100009
传 真 010-64014048

经 销 新华书店北京发行所
排 版 高等教育出版社照排中心
印 刷 北京民族印刷厂

开 本 850×1168 1/16
印 张 18.5
字 数 370 000

版 次 1999 年 9 月第 1 版
印 次 2000 年 8 月第 2 次印刷
定 价 20.10 元

凡购买高等教育出版社图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请在所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

《生物技术制药》编写人员

主编:熊宗贵

编者:(以姓氏笔划为序)

于荣敏(沈阳药科大学)

肖成祖(军事医学科学院生物工程研究所)

周正任(中国医科大学)

林永齐(吉林大学)

林琳(大连医科大学)

夏焕章(沈阳药科大学)

傅学奇(吉林大学)

熊宗贵(沈阳药科大学)

前 言

生物技术是一门具有悠久历史、又与现代科学和技术密切结合的学科。20世纪70年代以来,DNA重组技术等分子生物学技术的不断发展,赋予了生物技术崭新的内容,使之成为真正的高技术领域——现代生物技术。它促使工农业生产和医疗卫生事业发生了革命性的变化,特别是用于医疗卫生事业的医药生物技术的发展,使疾病的治疗和诊断、药物的研究和生产以及其他卫生保健事业出现了崭新的局面。其中最成功的是生物技术用于新型药物的研制,已有近30种基因工程药物投放市场,产生了巨大的社会效益和经济效益,对新药的研制、开发以及未来医药工业结构调整产生重大影响。有人预言,21世纪将是生命科学的世纪,医药工业被誉为21世纪的“朝阳产业”,特别是现代生物技术的迅速发展,更促进了当今世界制药工业的迅猛发展,所以我们应加速现代生物技术制药的人才培养,以迎接21世纪的挑战。

本教材系教育部“面向21世纪教学内容和课程体系改革”项目“生物技术制药六年制专业课程体系和教学内容改革研究和实践”的研究成果,是生物技术制药专业的专业课教材。根据现代生物技术与制药有着密切关系的几个主要技术,如基因工程、抗体工程、酶工程和动、植物细胞培养等进行编写,内容包括基因工程制药、抗体工程制药、酶工程制药和动、植物细胞培养制药等8章,既阐明它们的基本原理、方法和影响因素,又用实例说明如何利用这些新技术来研究和生产新型药物。其中第二章为生物药物概论,说明生物药物的天然来源和特性,展示了开发新的生物药物的源泉;第八章利用现代生物技术改造传统制药工业,展示了现代生物技术应用之广阔领域。关于生物技术中的发酵工程和下游的分离精制工程,可参考中国医药科技出版社出版的《发酵工艺原理》(熊宗贵主编)和《分离纯化工艺原理》(顾觉奋主编)以及其他有关资料。

本书是以医药生物技术的主要分支技术为基础来编写的,参加编写的皆是在各个领域中具有丰富教学、科研经验的教授和研究员,有熊宗贵(第1章,沈阳药科大学)、林永齐、林琳(第2章,吉林大学、大连医科大学)、夏焕章(第3、8章,沈阳药科大学)、周正任(第4章,中国医科大学)、肖成祖(第5章,军事医学科学院生物工程研究所)、于荣敏(第6章,沈阳药科大学)、傅学奇(第7章,吉林大学)。中国医学科学院医药生物技术研究所王以光教授等给予审查,并提出许多宝贵意见。还有许多同志参加制图、打字、校对等工作,在此均致以衷心的感谢。

由于生物技术发展快,涉及的知识领域宽广,限于编者的水平和时间仓促,错误和不足之处在所难免,希望读者批评指正。

编者 1999年3月

目 录

第一章 绪 论

一、概述·····	(1)	四、我国的医药生物技术·····	(12)
二、生物技术的发展简史·····	(3)	五、医药生物技术发展展望·····	(16)
三、医药生物技术的新进展·····	(8)	主要参考文献·····	(17)

第二章 生物药物概论

第一节 生物药物的来源、特性、分类与制备·····	(19)	四、动物来源药物的研究前景·····	(51)
一、生物药物的来源·····	(19)	第四节 植物来源的药物·····	(52)
二、生物药物的特性·····	(20)	一、植物来源药物的特点·····	(52)
三、生物药物的分类·····	(21)	二、植物来源药物的种类与用途·····	(52)
四、生物药物的制备·····	(22)	三、植物来源药物的制备实例·····	(55)
第二节 人体来源的药物·····	(25)	四、植物来源药物的研究前景·····	(58)
一、人体来源药物的特点与研究意义·····	(25)	第五节 海洋生物药物·····	(58)
二、人体来源药物的种类与用途·····	(26)	一、海洋生物药物的研究进展·····	(58)
三、人体来源药物的制备实例·····	(33)	二、海洋生物及海洋生物药物的种类与用途·····	(59)
四、人体来源药物的研究前景·····	(37)	三、海洋生物药物的制备实例·····	(60)
第三节 动物来源的药物·····	(37)	四、海洋生物药物的研究前景·····	(62)
一、动物来源药物的特点·····	(37)	五、生物技术在海洋药物研究与发展中的重要作用·····	(63)
二、动物来源药物的种类与用途·····	(38)	主要参考文献·····	(63)
三、动物来源药物的制备实例·····	(45)		

第三章 基因工程制药

第一节 概述·····	(65)	第三节 目的基因的获得·····	(67)
第二节 基因工程药物生产的基本过程·····	(66)	一、逆转录法·····	(68)

二、化学合成法	(70)	第八节 基因工程药物的分离纯化	(91)
第四节 基因表达	(71)	一、建立分离纯化工艺的根据	(92)
一、宿主细胞的选择	(71)	二、分离纯化的基本过程	(92)
二、大肠杆菌中的基因表达	(72)	三、分离纯化的技术	(92)
三、酵母中的基因表达	(78)	四、选择分离纯化方法的依据	(98)
四、动物细胞中的基因表达	(81)	第九节 基因工程药物的质量控制	(100)
第五节 基因工程菌的稳定性	(82)	一、原材料的质量控制	(100)
一、质粒不稳定产生的原因	(82)	二、培养过程的质量控制	(101)
二、提高质粒稳定性的方法	(83)	三、纯化工艺过程的质量控制	(101)
第六节 基因工程菌生长代谢的特点	(83)	四、目标产品的质量的控制	(101)
一、菌体生长与能量的关系	(84)	五、产品的保存	(104)
二、菌体生长与前体供应的关系	(85)	第十节 基因工程药物制造实例	(105)
第七节 基因工程菌发酵	(86)	一、基因工程菌的组建	(105)
一、基因工程菌的培养方式	(86)	二、基因工程干扰素的制备	(107)
二、基因工程菌的发酵工艺	(87)	三、质量控制标准和要求	(108)
三、基因工程菌的培养设备	(90)	主要参考文献	(109)

第四章 抗体制药

第一节 概述	(110)	第四节 基因工程抗体和抗体工程	(126)
第二节 单克隆抗体	(111)	一、噬菌体抗体库技术的基本方法	(126)
一、抗原与动物免疫	(111)	二、噬菌体抗体库技术的特点	(127)
二、细胞融合与杂交瘤细胞的选择性培养	(114)	三、基因工程抗体的表达	(127)
三、筛选阳性克隆与克隆化	(115)	第五节 抗体诊断试剂	(128)
四、杂交瘤细胞与抗体性状的鉴定	(117)	一、血清学鉴定用的抗体类试剂	(128)
五、单克隆抗体的大量制备	(117)	二、免疫标记技术用的抗体类试剂	(131)
六、单克隆抗体的纯化	(118)	三、导向诊断药物	(136)
第三节 鼠源性单克隆抗体的改造	(119)	第六节 抗体治疗药物	(137)
一、人-鼠嵌合抗体	(120)	一、放射性核素标记的抗体治疗药物	(137)
二、改形抗体	(120)	二、抗癌药物偶联的抗体药物	(137)
三、小分子抗体	(123)	三、毒素偶联的抗体药物	(138)
四、双功能抗体	(124)	主要参考文献	(140)
五、抗体融合蛋白	(125)		

第五章 动物细胞制药

第一节 概述	(142)	第五节 动物细胞培养的方法和操作方式	(161)
第二节 动物细胞的形态和生理特点	(143)	一、动物细胞大规模培养的方法	(161)
一、动物细胞的形态	(143)	二、动物细胞培养的操作方式	(165)
二、动物细胞的生理特点	(145)	第六节 动物细胞生物反应器及其检测控制系统	(166)
第三节 生产用动物细胞的要求和获得	(148)	一、动物细胞生物反应器的类型及其基本结构	(167)
一、生产用动物细胞的要求	(148)	二、动物细胞生物反应器的检测控制系统	(173)
二、生产用动物细胞的获得	(148)	第七节 动物细胞制药的前景与展望	(175)
三、常用生产用动物细胞的特性	(149)	一、提高产量、降低成本和改进质量方面的研究	(176)
四、基因工程细胞的构建和筛选	(151)	二、转基因动物的研究	(177)
五、细胞库的建立	(152)	三、组织工程的研究	(178)
第四节 动物细胞的培养条件和培养基	(153)	主要参考文献	(178)
一、动物细胞的培养条件	(153)		
二、动物细胞培养基的种类和组成	(156)		

第六章 植物细胞制药

第一节 概述	(180)	二、培养条件的影响	(199)
一、基本概念	(181)	第五节 植物细胞培养的生物反应器	(205)
二、植物细胞培养的发展简史	(182)	一、机械搅拌式生物反应器	(207)
第二节 植物细胞的形态和生理特性	(183)	二、鼓泡塔生物反应器	(208)
一、植物细胞的形态	(183)	三、气升式生物反应器	(208)
二、植物细胞的结构特征	(184)	四、转鼓式生物反应器	(209)
三、细胞内含物和生理活性物质	(188)	五、固定化细胞生物反应器	(209)
四、植物培养细胞的生理特性	(189)	六、各种生物反应器性能比较	(210)
第三节 植物细胞培养的基本技术	(190)	第六节 进展与展望	(210)
一、植物材料的准备	(190)	一、诱导子	(211)
二、培养基及其组成	(192)	二、前体饲喂	(211)
三、培养方法	(195)	三、两相法培养	(211)
第四节 影响植物次级代谢产物累积的因素	(197)	四、毛状根和冠瘿瘤培养	(212)
一、外植体选择	(198)	主要参考文献	(213)

第七章 酶工程制药

第一节 概述	(215)	反应器	(232)
一、酶的特性	(215)	一、反应器的类型和特点	(233)
二、酶工程简介	(215)	二、反应器的选择依据	(234)
第二节 酶的来源和生产	(216)	第五节 酶工程在医药工业中的应用	(236)
一、酶的来源	(216)	一、固定化细胞法生产 6-氨基青霉烷酸	(236)
二、酶的生产菌	(217)	二、固定化酶法生产 5'-复合单核苷酸	(237)
第三节 酶和细胞的固定化	(217)	三、固定化酶法生产 L-氨基酸	(239)
一、固定化酶的制备	(218)	第六节 酶工程研究的进展	(240)
二、固定化细胞的制备	(225)	一、酶的化学修饰	(241)
三、固定化方法与载体的选择依据	(226)	二、酶的人工模拟	(244)
四、固定化酶的形状与性质	(227)	三、有机相的酶反应	(247)
五、固定化细胞的形状与性质	(230)	四、基因工程酶的构建	(249)
六、固定化酶活力的测定方法	(231)	主要参考文献	(250)
第四节 固定化酶和固定化细胞的			

第八章 利用现代生物技术改造传统制药工业

第一节 基因工程在抗生素生产中的应用	(253)	二、在维生素生产中的应用	(275)
一、克隆抗生素生物合成基因的策略和方法	(253)	第三节 基因工程在生物制品制造中的应用	(277)
二、几种典型的抗生素生物合成基因簇的结构	(259)	第四节 基因工程在新药研究中的应用	(279)
三、提高抗生素产量	(263)	一、靶酶	(280)
四、改善抗生素组分	(267)	二、受体	(281)
五、改进抗生素生产工艺	(268)	第五节 细胞工程在传统制药工业中的应用	(282)
六、产生杂合抗生素	(269)	一、提高代谢产物的产量	(282)
第二节 基因工程在氨基酸和维生素生产中的应用	(274)	二、改变抗生素的组分	(283)
一、在氨基酸生产中的应用	(274)	三、产生新化合物	(283)
		主要参考文献	(284)

第一章

绪 论

一、概述

生物药物是泛指包括生物制品在内的生物体的初级和次级代谢产物或生物体的某一组成部分,甚至整个生物体用作诊断和治疗疾病的医药品。采用现代生物技术人为地创造一些条件,借助某些微生物、植物或动物来生产所需的医药品,叫做生物技术制药。一般来说,采用 DNA 重组技术或其他生物新技术研制的蛋白质或核酸类药物,可称为生物技术药物。

生物技术(biotechnology)是当今国际上重要的高技术领域,我国多数学者认为,生物技术是以生命科学为基础,利用生物体(或生物组织、细胞及其组分)的特性和功能,设计构建具有预期性状的新物种或新品系,并与工程相结合,利用这样新物种(或品系)进行加工生产,为社会提供商品和服务的一个综合性的技术体系。它所含的主要技术范畴有:基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程、生化工程以及后来衍生出来的第二代、第三代的蛋白质工程、抗体工程、糖链工程和海洋生物技术等。与生物技术相关的学科很多(见图 1-1),有生物学(含微生物学、分子生物学、遗传学等)、化学、工程学(化学工程、电子工程等)、医学、药学、农学等。但从基础学科来讲,生物学、化学和工程学是其主要的学科。正因为如此,生物技术是一门多学科的综合技术体系,而不是单学科的技术体系。因此,要求从事生物技术研究 and 开发生产的人员,要尽可能地掌握全面的知识,并能与有关学科协作从事研究。特别是,当今生物技术已不像初期那样停留在技术操作阶段,而是向纵深发展,并与其他学科交叉,形成了许多分支学科。比如生物体的生命信息,过去都是以生物信息为特征,如今计算机科学的大力发展,促进了计算机科学和生命科学相结合,形成了一门新的学科——生物信息学。它已成为生命科学研究中不可缺少的内容,能够快速分析得到的生物信息,使生物学家更好地理解生命现象和疾病的发生过程,也能使药物学家发现更好的新药。生物技术研究的对象已从微生物扩展到动、植物,从陆地生物扩展到海洋和空间生物,因而继 20 世纪 80 年代出现的第二代蛋白质工程之后,又出现了第三代生物技术——海洋生物技术,这就大大地扩展了研究范围。今后,生物技术研究的广度和深度还会不断扩展,需要我们掌握更全面和坚实的知识 and 理论。

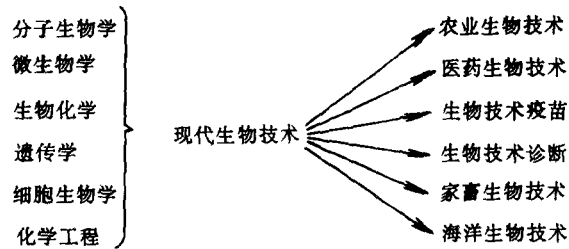


图 1-1 现代生物技术的基础学科和分支

生物技术的研究成果越来越广泛地应用于农业、医药、食品、能源和环保等领域,日益显示出它在解决人类面临的难于解决的问题中的巨大作用,其分支见图 1-1。在农业上,获得了转基因动植物的新品种,使农业(包括农、林、牧、渔业)能较大幅度地提高产量和质量;在工业上,利用生物资源为原料或应用生物技术为手段,为包括食品、医药、轻工、化工等的工业生产带来了新的生命力;在环境保护等其他领域中,也都获得了良好的效果。特别是在医药行业,成果更为显著。自 20 世纪 80 年代以来,仅美、日两国开发的生物技术新药物便达 200 余种,大部分都是重组蛋白质药物和重组 DNA 药物。目前,在美国已有 50 多种生物药物、疫苗和生物制剂投放市场,还有几百种各类生物制剂已在临床试验,可望投入市场。

生物技术最早应用的产业领域是医药行业,在市场上的销售额很高。从 1977 年出现第一个重组的生长激素抑制因子(somatostatin)后,美国就成立了第一家遗传工程公司——Genetech,进行小牛和小猪的生长激素的开发研究,与其他公司合作开发了 α 、 β -干扰素的生产技术,又取得了礼来公司的人胰岛素的世界独家销售权。从此以后,相继出现了许多生物技术公司。1981 年第一个诊断用单克隆抗体首先在美国正式上市;1982 年第一个基因工程技术生产的人胰岛素得到批准,投放市场,第一个基因工程疫苗也正式上市;抗 T 细胞分化抗原 OKT3 单抗是第一个单抗新药,于 1986 年也被批准投放市场,用于治疗肾移植后,作为抗排斥反应的药物,有效率达 94%。此后十几年中,陆续被批准上市的产品已达几十种,正在临床试验的产品达几百种。

利用基因治疗人类疾病的基因医疗技术已取得了突破性进展,技术研究日新月异,有可能革新整个医学的预防和治疗领域。原本用于治疗单基因缺陷的遗传病的基因治疗技术,现在已快速扩展到治疗癌症、爱滋病、乙型肝炎、心血管病等严重疾病,有望能取得良好效果。

除基因工程药物和基因治疗技术外,诊断试剂、酶制剂,动、植物医药产品、核酸类药物以及利用现代生物技术改造传统生物药物等方面,也取得了比较丰富的成果。因而,医药生物技术在整个生物技术领域中是最为活跃的一部分。

随着生物技术的发展 and 广泛应用,其产业化水平也不断提高。据统计,美国有关生物技术研究和开发的公司达 1 000 多家,欧洲和日本也有几百家。在美国的这些公司中从事医药生物技术研究和产品开发经营的占 70%,形成规模化生产的有 Amgen 等 20 多家,市场资本总额超过 400 亿美元,年研究经费达 50 亿美元以

上。目前,美国的生物技术公司大部分集中在医药保健品领域中,而欧洲生物技术公司最主要的技术领域是生物药物的传递研究,其次是肽类、天然产品、人工合成小分子的研究,再其次是疫苗、重组 DNA 等的研究。大多生物技术公司的产品销售额中的产业收益均在 10% 以上。所以说,生物技术产业虽然是近十几年兴起的新兴产业,不少生物技术产品尚处于研究试验阶段,商品化发展也遇到风险和曲折,但是,生物技术产业化趋势是不可逆转的,估计到 2010—2020 年,这一产业将逐步成为世界经济体系的支柱产业之一。

二、生物技术的发展简史

生物技术,从广义角度来看,是人类对生物资源(包括微生物、植物、动物)的利用、改造并为人类服务的技术。人类在古代时就能利用生物体和古老的技术来生产各种产品,并为自身服务,如酿酒、制醋就是人类最早通过实践所掌握的古老的生物技术,还有酱和酱油、泡菜、奶酒、干酪等的制作以及面团发酵、粪便和秸秆沤制、以霉制病等技术。因而,生物技术的发展过程按其技术特征来看,可以分为 3 个不同的发展阶段:即传统生物技术、近代生物技术和现代生物技术。

1. 传统生物技术阶段

传统生物技术的应用已有悠久的历史。远在公元前几千年,就有了酿酒和制醋的生产技术,因而它的技术特征是酿造技术。但是,人们在很长的时期内,不知道这些技术的内在原因。直到 1680 年出现了显微镜,才知道自然界有微生物的存在。1857 年,利用实验的方法证明了酒精发酵是活酵母所引起的结果,其他发酵产物则是由其他微生物发酵所形成的。1897 年,发现了磨碎的“死”酵母仍能使糖发酵而形成酒精,并将其中所含的活性物质称为“酶”。经过这一系列的研究,才揭开了发酵现象的奥秘。

由于上述研究结果的启示,从 19 世纪末到 20 世纪 30 年代,陆续出现了许多产品的工业发酵,开创了工业微生物的新世纪。生产出的产品有:乳酸、酒精、丙酮-丁醇、柠檬酸、淀粉酶等。这些产品的生产过程比较简单,大多数属于嫌气发酵或表面培养,生产设备的要求也不高。产品的化学结构较为简单,属于微生物的初级代谢产物。

2. 近代生物技术阶段

20 世纪 40 年代初,由于第二次世界大战的爆发,急需疗效好而毒副作用小的抗细菌感染药物。1941 年,美国和英国合作开发研究了 1928 年英国 Fleming 发现的、并于 1940 年经 Florey 及 Chain 等提取、又经临床证明具有卓越疗效且毒性低的青霉素。并经过深入研究,终于在原需花费大量劳动力(从清洗、装料、灭菌、接种、培养到出料等过程)和占用大量空间(生产 1kg 含量为 20% 的青霉素要用约 80 000 个 1L 的培养瓶)、产品的价格非常昂贵的表面培养法生产青霉素的基础上,研究开发出生产效率高、产品质量好、通入无菌空气进行搅拌发酵的浸没培养法生产技术,发酵罐的体积最初即达 5 m³,产品的产量和质量、生产效率大幅度提高,成本显著下降。这给生物技术的发酵工业带来了革命性的变化,因而微生物发酵

技术是近代生物技术的基础技术。以后,又开发了一系列发酵新技术,如无菌技术、控制技术、补料技术等。这就开始了当代微生物工业的兴旺发达。

以后,链霉素、金霉素、红霉素等抗生素相继问世,兴起了抗生素工业,促使工业微生物的生产进入了一个新的阶段。抗生素生产的经验很快促进了其他发酵产品的发展,最突出的是20世纪50年代的氨基酸发酵工业、20世纪60年代的酶制剂工业以及一些原来用表面培养法生产的产品生产都开始改用沉没培养法。近代生物技术产业的主要产品有:医药业的抗生素、维生素、甾体激素、氨基酸;轻工食品业的工业酶制剂、食用氨基酸、酵母、啤酒;化工业的酒精、丙酮、丁醇、沼气;农林业的农用抗生素等农药;环境保护业的生物治理污染等。

近代生物技术时期的特点有:①产品类型多。不但有生物体的初级代谢产物(氨基酸、有机酸、酶制剂、多糖等),还有次级代谢产物(抗生素等)、生物转化(甾体化合物等的转化)、酶反应(如6-氨基青霉烷酸的酰化反应)等产品。②生产技术要求高。主要表现在发酵过程中,要求在纯种或无杂菌条件下进行运转;大多数生物体是需氧菌,需要通入无菌空气进行好气发酵;发酵产品不少是医药用品或食品,产品质量要求也非常严格。③生产设备规模巨大。从发酵罐看,常用的搅拌通气罐可大至500 m³;技术最高、规模最大的单细胞蛋白工厂的气升式发酵罐的容积已超过2 000 m³。④技术发展速度快。以发酵工业中提高产品的产量和质量所需的关键物质菌种为例,其活力和性能获得了惊人的提高。如青霉素发酵菌种,初期的发酵效价仅为200 U/ml,目前国际上已达80 000 U/ml,可见其发展速度之快。发酵控制技术等也得到了前所未有的提高。

与此同时,在理论与实践相结合的基础上,化学工程学者参与了发酵过程的开发研究,经过大量的实践和理论探讨,在20世纪40年代,形成了生物学科与化学学科相交叉的新兴学科——生化工程,并得到迅速发展,如今已成为现代生物技术的组成部分。

3. 现代生物技术

1953年美国的Watson和英国的Crick共同提出了生命基本物质DNA的双螺旋结构模型。这项20世纪生命科学的重大发现揭开了生命科学划时代的一页。此后,科学家们又研究出了一系列现代生物技术的新发现和新进展(见表1-1),这为分子生物学和分子遗传学的建立与发展以及DNA的重组技术研究奠定了基础。此后,这些基础研究的成果很快地向应用研究和开发研究拓展。1973年美国的Boyer和Cohen首次在实验室中实现了基因转移(见图1-2),为基因工程启开了通向现实的大门,使人们有可能在实验室中组建按自己愿望设计出来的新的生命体。

1977年美国Boyer首次用基因操纵手段获得了生长激素抑制因子(somatostatin)的克隆。1978年Gilbert接着获得了鼠胰岛素的克隆。1982年以后,基因工程产品人胰岛素和疫苗都准许投放到市场,自此之后的十余年中,陆续批准上市的基因工程药物已有30种,见表1-2,上百种以上的产品正在临床试验中经受考验。

1975年英国的Milstein和Kohler发明了杂交瘤技术,他们用来自脾脏的、能产生抗体的 β -淋巴细胞和能在体外无限繁殖的骨髓瘤细胞,用原生质体融合技

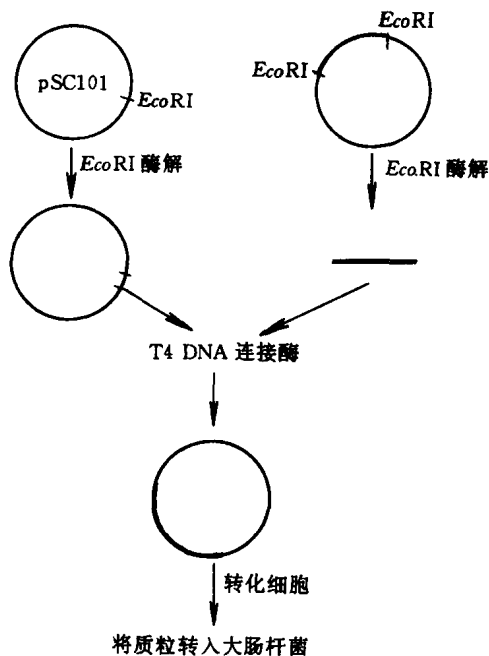


图 1-2 Boyer 和 Cohen 的 DNA 重组实验

表 1-1 1953 年以来现代生物技术的主要发现和进展

年 代	主要发现和进展
1953 年	提出了 DNA 互补双螺旋结构模型
1956 年	提出了遗传信息是通过 DNA 的碱基对顺序来传递的理论
1957 年	论证了 DNA 的复制过程包括双螺旋互补链的分离
1958 年	分离得到 DNA 多聚酶 I, 用在试管内合成得到 DNA
1960 年	发现信使 RNA(mRNA), 并证明 mRNA 传递信息指挥蛋白质的合成
1966 年	破译了全部遗传密码
1967 年	分离得到 DNA 连接酶
1970 年	发现第一个限制性内切酶, 发现逆转录现象
1971 年	用限制性内切酶酶切产生 DNA 片段, 用 DNA 连接酶得到第一个重组 DNA 分子
1972 年	合成了完整的 tRNA 基因
1973 年	Boyer 和 Cohen 建立了 DNA 重组技术
1975 年	Kohler 和 Milstein 建立了单克隆抗体技术
1976 年	DNA 测序技术诞生
1978 年	Genentech 公司在大肠杆菌中表达出胰岛素
1981 年	第一个单克隆抗体诊断试剂盒在美国被批准使用
1982 年	用 DNA 重组技术生产的第一个动物疫苗在欧洲被批准使用
1983 年	基因工程 Ti 质粒用于植物转化
1988 年	PCR 方法问世
1990 年	美国批准第一个体细胞基因治疗方案
1997 年	英国培养出第一只克隆羊多莉
1998 年	美国批准艾滋病疫苗进行人体实验

表 1-2 美国已批准上市的基因工程药物(1997年7月)

中文名称	商品名称	英文名或缩写	开发生产公司
胰岛素	Humulin	insulin	Lilly
	Novolin		Novo Nordisk
	Humalog	lispoinsulin	Lilly
人生长激素	Protropin	rhuHGH	Genentech
	Humatrope		Lilly
	NutropinAQ		Genentech
干扰素	Intron A	rhuIFN α 2b	Schering
	Referon A	rhuIFN α 2a	Roche
	Avonix	rhuIFN β	Biogen
	Betaseron	rhuIFN β 1b	Chiron
	Actimmune	rhuIFN γ 1b	Genentech
	Alferon - N	rhuIFN α n3	Interferon Science
白细胞介素-2	Proleukin	rhuIL-2	Chiron
粒细胞集落刺激因子	Neupogen	rhuG-CSF	Amgen
粒细胞巨噬细胞集落刺激因子	Leukine	rhuGM-CSF	Immunex
红细胞生成素	Epogen	rhuEPO	Amgen
	Procrit		Ortho
组织溶纤原激活剂	Activase	rhuTPA	Genentech
生长激素	Serostim	somatotropin	Serono
促生长素	Nutropin	somatopin	Genentech
	Saizen		Serono
	Genotropin		Pharma/Upjohn
	Norditropin		Novo Nordisk
	Bio-Tropin		Biotech General
	抗血友病因子Ⅷ	Kogenate	factor Ⅷ
	Recombinate		Baxter
葡糖脑苷脂酶	Cerezyme	glucocerebrosidase	Genzyme
脱氧核糖核酸酶	Pulmozyme	dornase	Genentech
乙型肝炎疫苗	Recombivax HB	hepatitis B vaccine	Merck
	Engerix B		Smith Kline
	Comrax		Merck
甲型肝炎疫苗	Havrix	hepatitis A vaccine	Smith Kline
体内用单克隆抗体	Reopro	MAB, blood clots	Centocor
	Ortho OKT-3	MAB, kidney sup	Ortho Biotech
	Onco Scint CR/OV	MAB, diag inject	Cytogen
	Onco Scint OC103		Cytogen
	Onco Scint CR103		Cytogen
	Prostascint		Cytogen
鼠单克隆抗体	Panorex	murine MAB	Glaxo Welcome

术进行细胞融合,获得了既能在体外培养又能产生单一抗体的杂交细胞,称为杂交瘤细胞。它们的产品是单克隆抗体(McAb)。由于 McAb 具有高度均一性、高度特异性及来源稳定、可大量生产等特点,单抗已用作医疗上的临床诊断试剂或生化治疗剂,并成为一大类的现代生物技术产品。原生质体融合技术可用于分类学中亲缘关系较远的生物体细胞之间的杂交,这对农作物品种和牲畜品种的改良具有巨大的潜力,也适用于工业微生物的性能改良。

当鼠源性 McAb 用于人体疾病的诊断或治疗时,因其自身具有抗原性,容易引起过敏反应,多次应用后,会因体内产生抗体使其被中和而失去效果。因此制备人源性 McAb 是人们长期追寻的目标。但人 McAb 技术发展缓慢,这就大大刺激了基因工程抗体的研究和发展。因此一门以基因工程技术为基础对抗体结构进行改造的新兴分支学科——抗体工程应运而生。它可以通过原核生物细胞或昆虫细胞表达抗体小分子有效部位,进行大规模生产。利用基因工程技术已制备了嵌合抗体、改形抗体、小分子抗体及完全人源化抗体等基因工程抗体。若将由淋巴细胞杂交瘤技术产生的 McAb 作为第二代抗体,则基因工程抗体就可称为第三代抗体。

属于细胞工程的动、植物细胞培养,历史是比较早的。现在人们已能利用微生物的大量培养技术来生产各种酶、抗生素、蛋白质等产物。然而,许多有重要价值的蛋白质等生物药物,必须借助动、植物细胞的培养来获得,例如,病毒疫苗、干扰素、单克隆抗体等。

动物细胞培养又称组织培养,早期是以组织切片来进行培养的,后来改进为单细胞培养,并成为生产疫苗等为目的产物的培养手段。1975年后,才建立了以大量制备有用细胞成分为目的的培养设施而进入新的阶段。它不仅用于生产人类疫苗,而且随着转基因动物细胞的成功,还可生产人生长激素、人胰岛素、干扰素等物质。例如利用转基因的猴肾细胞,以 1×10^7 个细胞计,每日最高可获得近1mg的生长激素。动物细胞培养虽然比微生物培养复杂的多,但由于大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌等微生物作为基因工程宿主来表达外来基因,获得的目的蛋白质虽然氨基酸顺序是正确的,但其立体结构常有错误需要通过重叠才可具有生理活性,而用动物细胞培养进行表达所获得的产物,就不存在这样的缺点,所以基因工程又推动了动物细胞培养技术的发展。动物细胞表达系统还没有细菌转录及修饰所存在的缺乏糖基化的缺陷。所以,用动物细胞培养技术来生产含糖链的多肽类生物活性物质,也是新药开发的热门领域。

植物细胞培养一般采用离体条件培养方法,它是在植物组织培养技术基础上发展起来的。1902年 Haberlandt 确定了植物的单个细胞内存在其生命体的全部能力,这就是植物组织培养的开端。其后,为了实现分裂组织的无限生长,在植物及培养基的选择等方面进行了探索。20世纪30年代,组织培养取得了飞速发展,使细胞在植物体外无限生长成为可能。1939年 Gautheret、Nobercourt 等人分别成功地培养出烟草、萝卜等形成层组织。至此组织培养才真正开始。20世纪50年代, Talecke 和 Nickell 确定了植物细胞能够成功地生长在悬浮培养物中;1956年 Nickell 和 Routin 第一个用植物组织培养生产出化学物质,此后应用组织培养