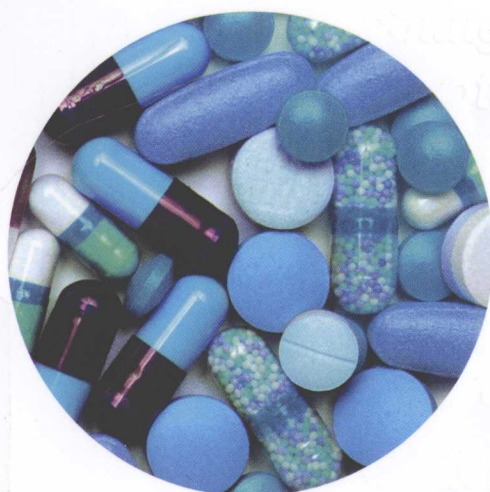


高等学校制药工程专业规划教材

基因工程制药

Genetic Engineering of Pharmaceuticals

李德山 ◎ 主编 任桂萍 ◎ 副主编



化学工业出版社

本书可作为高等院校制药工程专业及相关专业的教材，也可供从事制药工程工作的工程技术人员参考。

基因工程制药

Genetic Engineering of Pharmaceuticals

李德山 ○ 主编 任桂萍 ○ 副主编



本书可作为高等院校制药工程专业及相关专业的教材，也可供从事制药工程工作的工程技术人员参考。

化学工业出版社

· 北京 ·

本书共分五章,全面系统地介绍了基因工程制药概论、基因工程制药、抗体工程制药、基因工程药物设计与研制方法、基因工程疫苗等内容,涵盖了研发基因工程药物的基本理论和相关技术。全书具有较强的理论性、科学性。

本书适合各高等院校生物制药专业及相关专业学生教学使用,也可供制药行业从事研究、设计和生产的工程技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程制药/李德山主编. —北京:化学工业出版社, 2010.1
高等学校制药工程专业规划教材
ISBN 978-7-122-07182-8

I. 基… II. 李… III. 药物-制造-基因工程-
高等学校-教材 IV. TQ460.38

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 215814 号

责任编辑:何 丽
责任校对:陈 静

文字编辑:李 瑾
装帧设计:关 飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 刷:北京市振南印刷有限责任公司
装 订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张13 字数344千字 2010年2月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:25.00 元

版权所有 违者必究

《基因工程制药》编写人员

主 编 李德山

副 主 编 任桂萍

编写人员 (按姓氏笔画排名)

丁良君 王文飞 尹成凯 尹杰超 叶贤龙

朱慧萌 任桂萍 刘生伟 刘铭瑶 孙国鹏

李 璐 李晋南 李德山 吴 桐 吴云舟

张 薇 郝景波 侯玉婷 姜媛媛 姚文兵

徐黎明 高华山

前言

现代生物技术 (Biotechnology) 的核心是重组 DNA 技术。1972 年, 斯坦福大学 Paul Berg 博士创造了第一个重组 DNA, 从而掀开了现代生物技术的新纪元。之后, 加利福尼亚大学 Herbert Boyer 教授与 Eli Lilly 制药公司一起研制出人重组胰岛素, 并于 1982 年正式推向市场, 开创了基因工程制药的历史, 开始了现代生物医药的商品化时代, 即生物经济时代。在此之后的 20 多年中, 基因工程制药得到了迅速发展。随着分子生物学的不断进步, 如 PCR/RT-PCR 技术, 基因芯片技术, 荧光定量 PCR 技术, RNA 干扰技术的问世, 特别是人类基因组计划的完成, 更加速了基因工程制药的发展步伐。

21 世纪是生物技术世纪, 一场生物产业革命正在兴起。在小分子药物陷入低谷的 21 世纪初始, 生物医药却独树一帜, 犹如初生的朝阳, 蓬勃发展, 生物医药公司纷纷成立。据美国生物技术工业组织统计, 截至 2004 年 3 月中旬, 美国已有 1473 个生物技术制药公司, 总资产超过 3110 亿美元, 雇员近 20 万人。生物技术制药已成为美国的重要产业之一。全球范围内正在研制的生物药物有 2000 多种, 其中 80% 已进入临床试验。由于生物医药产品解决了常规药物无法解决的医学难题, 生物医药产品的回报率令人瞩目, 销售额逐年攀升。根据 Johnson & Johnson 2008 年的年终报告, 年销售额最高的药物是治疗类风湿性关节炎的抗 TNF- α 抗体药物-Remicade (infliximab), 2008 年销售额达 37.48 亿美元, 比 2007 年增长 12.7%; 治疗贫血的药物重组红细胞生成素 Procrit (Epoetin alfa) 2008 年销售额达 24.6 亿美元, 比 2007 年增长了 14.7%。重组蛋白药物逐渐成为治疗人类重大疾病的主流药物。

我国生物医药领域起步较晚, 技术方面还相对落后。但是中国对生物医药领域的发展给予了高度重视, 2007 年国务院制定了我国“十一五”生物产业发展规划, 把生物医药产业作为拯救千百万危重病人的民生工程, 作为提高中华民族国际地位的世纪工程之一。截至 2007 年, 全国进入临床研究的生物新药已达 150 多个, 已有基因工程干扰素等 21 种生物技术药物投入生产, 脑恶性胶质瘤、血友病 B 等疾病的 6 种有自主知识产权的基因治疗方案进入临床阶段。

中国的生物医药事业正方兴未艾, 需要大量的技术人员和后备力量。本人曾在美国 Eli Lilly 制药公司工作多年, 从事生物医药的研发工作, 积累了大量的理论基础和实践经验。2006 年回国, 为将一生所学献给祖国的生物医药事业, 特组织有关专家学者编写此书。

生物医药的核心是重组蛋白药物, 本书以当前国际上竞争最激烈的基因工程药物、抗体工程药物和基因工程疫苗为重点, 并涵盖了研发基因工程药物的基本理论和相关技术。此书将面向 21 世纪高等学校生物制药专业的学生和教师, 以及具有一定生物学基础的生物制药公司、企事业的专业技术人员和管理人员。希望此书的出版能为祖国生物医药的发展尽微薄之力。

在此书完成之际, 感谢李宁、谷学佳、高学慧、高振秋、郝健权、曲栗、张巧、齐云峰、王菁、颜世君、孙阳、王琪、高红梅、王秋颖、张振宇、张宇、刘艾林、曹荣邱和刘雪莹等在书稿的校对过程中付出的辛勤工作。

由于时间仓促和水平所限, 书中难免有不妥之处, 望读者批评指正, 在此表示不胜感谢。

李德山

2009 年 9 月

目 录

第一章 基因工程制药概论	1
第一节 基因工程制药的发展历史	1
一、传统的生物制药技术是现代生物制药的基础	1
二、基因工程制药是现代生物技术制药发展的核心	2
三、基因工程制药的现状 & 前景	3
第二节 基因工程药品的研发过程	4
一、基因工程药品的实验室研究阶段	5
二、基因工程药品的开发阶段	5
三、基因工程药品的临床实验	6
参考文献	7
第二章 基因工程制药	9
第一节 制药基因的克隆	9
一、制药基因的获得	9
二、制药基因与载体分子的体外连接反应	15
三、将人工重组 DNA 分子导入到能够正常复制的宿主细胞中	23
四、重组子的鉴定和筛选	24
第二节 重组蛋白表达系统	25
一、原核表达系统	25
二、酵母表达系统	28
三、昆虫细胞表达系统	31
四、哺乳动物细胞表达系统	33
五、转基因植物表达系统	37
六、转基因动物表达系统	40
七、表达系统的选择	43
第三节 蛋白的分离纯化	43
一、蛋白样品的前期处理	44
二、蛋白分离纯化主要方法	44
三、包涵体的分离纯化	53
四、抗体的分离纯化	56
第四节 转染技术	58
一、转染方法	58
二、优化转染条件	63
三、报告基因	63
第五节 融合标签	65
一、融合标签的特征 & 分类	65
二、融合标签各论	65
第六节 已投入市场的基因工程药物	70
一、治疗用激素	70
二、干扰素	77
三、造血因子 & 凝血因子	81
四、白细胞介素	85
五、最新投入市场的药物	86
参考文献	87
第三章 抗体工程制药	88
第一节 抗体	88
一、抗原、抗体的概念 & 抗原抗体的关系	88
二、抗体的分子结构、功能 & 其酶解片段	88
三、免疫球蛋白基因的结构 & 抗体多样性	96
第二节 单克隆抗体	100
一、单克隆抗体产生的基本原理	100
二、单克隆抗体的应用	101
第三节 基因工程抗体	102
一、基因工程抗体的特点	102
二、基因工程抗体的应用	102
第四节 抗体的氨基酸顺序	105
第五节 抗体分子的克隆	108
一、抗体基因克隆的方法	108
二、抗体基因克隆中的重要技术环节	110
三、嵌合抗体	113
四、改形抗体	115
五、表面氨基酸残基的“人源化”——镶面抗体	119
六、表位印迹选择	119
七、单链抗体	120
八、双特异性 & 多特异性抗体	123
九、小分子抗体	127
第六节 筛选抗体克隆的展示技术	129
一、噬菌体展示技术	129
二、酵母表面展示系统	132
三、核糖体展示技术	134
四、细菌表面展示技术	136
五、噬斑印迹	138
六、质粒展示技术	138

第七节 抗体亲和力的优化	140	四、使用寡核苷酸技术证实药物分子	169
一、鼠源及其嵌合抗体的人源化	140	五、基因功能的系统分析	169
二、通过改进亲和力来增加抗体的 功效	140	六、使用生物模型发现新药	170
三、通过选择性的改进结合速率常数增加 抗体功效	141	七、新药开发的展望	171
四、构建广谱抗体	141	参考文献	171
第八节 抗体药物	142	第五章 基因工程疫苗	173
一、概述	142	第一节 疫苗的概述	173
二、FDA 已批准的部分抗体（按时间 顺序排列）	143	一、疫苗发展简史	173
参考文献	150	二、疫苗的种类	174
第四章 基因工程药物设计与研制 方法	151	三、疫苗基本成分和性质	174
第一节 重组蛋白药物的复制	151	四、疫苗免疫途径	175
一、复制生物技术药品的一般技术 流程	152	第二节 传统疫苗及其研发原则	176
二、复制重组蛋白药品存在的问题	152	一、灭活疫苗	176
第二节 通过对现有药物的优化和改造研发 新药	154	二、弱毒疫苗	178
一、定向突变	155	第三节 基因工程疫苗及其研发原则	180
二、定点突变	160	一、合成多肽疫苗及其研发原则	180
三、糖基化工程与新药研究	166	二、亚单位疫苗及其研发原则	181
第三节 创新药物设计	167	三、基因缺失疫苗及其研发原则	182
一、通过筛选同源基因的方法发现新的药 物基因或药物靶基因	168	四、重组活载体疫苗及其研发原则	183
二、通过 RNA 的表达谱筛选新的药物基 因和靶基因	168	五、核酸疫苗及其研发原则	187
三、蛋白质组学	168	第四节 其他疫苗	190
		一、T 细胞疫苗	190
		二、树突状细胞疫苗	191
		三、肿瘤疫苗	194
		四、避孕疫苗	195
		第五节 免疫佐剂	196
		一、免疫佐剂的定义和特点	196
		二、佐剂的种类	197
		参考文献	201

第一章 基因工程制药概论

第一节 基因工程制药的发展历史

自古以来，人们在不懈地与疾病作斗争的过程中总结出了大量的宝贵经验和成果，其中，生物制药技术便是这些成果中的一枝奇葩。

在古代，生物制药指的是利用动植物等天然存在的生物制作药物。18 世纪，人们开始开发以生物制药学和生物学为基础的治疗产品。半个世纪以来，人们对 DNA 及蛋白质的结构的研究越来越深入，清楚地认识了其结构，以及对各种生化制品的分离纯化的技术越来越成熟，基因工程制药便应运而生。基因工程制药是利用重组 DNA 技术，结合发酵工程、细胞工程、酶工程等现代生物技术研制预防和治疗人类、动物重大疾病的蛋白质药物、核酸药物，以及生物制品的一门技术。由于新技术的开发和利用，基因工程制药是一门朝阳产业，具有无比的生命力，并且在今后相当长的一段时期里还会不断地发展进步。

一、传统的生物制药技术是现代生物制药的基础

在我国，人们利用生物制药可追溯到公元前。那时，人们已经开始利用动植物来治疗疾病。早在公元前 597 年就有使用类似植物淀粉酶类物质的记录，其后葛洪著《肘后良方》、沈括著《沈存中良方》进一步扩展了生物药物的使用，直至明代李时珍著《本草纲目》将中医药的应用和发展推到了一个历史的高峰期。

几千年来中国劳动人民在与疾病作斗争的过程中，通过不断的实践、认识，逐渐积累了丰富的医药知识。中国医药学数千年的历史，是中国人民长期同疾病作斗争的极为丰富的经验总结，对中华民族的繁荣昌盛有着巨大的贡献。由于药物中植物类占大多数，所以记载药物的书籍便称为“本草”。直至今今，中医药仍具有很大的发展潜力。中医药取材广泛，遍及动物、植物、微生物。除了人们熟知的草药外，各种真菌类、动物器官，甚至是一些动物的排泄物也可入药（如五灵脂，又称寒雀粪，为鼯鼠科动物橙足鼯鼠和飞鼠的干燥粪便）。

现今，我国的科学工作者用人工方法或生物学技术将中草药的有效成分大量生产，并研究其作用机理，使我国流传了几千年的中草药有了新的发展。

在西方，是从人们利用牛痘疫苗预防天花开始。1796 年，英国医生琴纳（Jenner）发明了用牛痘疫苗预防天花病的方法，从此，用生物制品预防传染病得以肯定。1860 年，巴斯德发现细菌，为抗生素的发现奠定了基础。1928 年英国人弗莱明（Fleming）发现青霉素，标志着抗生素时代的来临，并推动了发酵工业的快速发展。1941 年青霉素在美国开发成功。青霉素的大量生产挽救了一大批病人，使他们免于细菌感染所导致的死亡，特别是在第二次世界大战中拯救了许多伤病员。随后，美国人瓦克斯曼（Waksman）第一个将从放线菌中发现的链霉素作为抗菌药品治疗结核病，并取得了令人振奋的效果。在 20 世纪 50 年代，各种不同类型的抗生素相继被发现，同期又发现了黑根霉可进一步转化孕酮成 11 α -羟基孕酮，从而使可的松的大量生产成为可能。

20 世纪 60 年代以来，从生物体内分离纯化酶制剂的技术日趋成熟，酶类药物得到广泛

应用。尿苷激酶、链激酶、溶菌酶、天冬酰胺酶、激肽酶等已成为具有独特疗效的常规药物。70 年代, Zenk 等人开始研究应用植物细胞培养技术来生产植物药物。

传统的生物制药技术的成就, 无论在东方还是西方, 都是人们在对更好的医疗卫生条件、更高生活质量的不断追求中取得的, 是以不断前进的自然科学发展为基础的。随着现代科技的迅猛发展, 以生物技术等高新技术为标志的新科技革命的到来, 生物制药也掀起了一次新的发展浪潮, 以基因工程制药为核心的现代生物制药为生物制药产业注入了强劲的动力, 打开了光辉的前景。

二、基因工程制药是现代生物技术制药发展的核心

现代生物技术是指对生物有机体在分子、细胞或个体水平上通过一定的技术手段进行设计操作, 为达到一定的目的, 改良物种质量和生物大分子特性或生产特殊用途的生物大分子物质等, 包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程, 其中基因工程为核心技术, 是基因工程制药的基础。

20 世纪 50 年代, 沃森、克里克提出了 DNA 双螺旋理论, 为基因工程制药奠定了理论基础。70 年代, 发展的重组 DNA 技术、单克隆抗体技术使生物制药进入到基因工程制药这一崭新的时代。自 1982 年, 第一个基因工程药物人胰岛素上市到 1992 年的十年间, 上市了 19 种基因工程药物。现在, 世界基因工程制药技术的产业化已进入投资收获期, 现代生物技术药品已应用和渗透到医药、保健食品和日化产品等各个领域, 尤其在新药研究、开发、生产和改造传统制药工业中得到日益广泛的应用, 其中基因工程制药产业已成为最活跃、进展最快的产业之一。

基因工程药物的研究开发和产业发展除了具有医药产品研发和生产经营行为中一些共同的特征外, 还具有基因制药行业独有的个性特征, 主要体现在以下几个方面。

(1) 高技术 主要表现在其所必需的高层次专门人才和高技术手段方面。基因工程药物研发是一种知识密集、技术合力高、多学科相互渗透的新兴产业, 它涉及诸如基因的合成、目标蛋白的纯化及工艺放大、产品质量的检测及保证等复杂环节。因此, 具有高素质的专业研制人员, 具有较高管理水平、知识水平和先进理念的经营人员, 具有前沿特征的高技术组合构成基因工程药物高技术的特征。

(2) 长周期 基因工程药物从开始研制到最终转化为产品上市要经过很多复杂的环节: 实验室研究阶段、中试生产阶段、临床试验阶段、规模化生产阶段、市场商品化阶段以及监督环节等, 各阶段均须通过严格复杂的药政审批程序, 而且产品培养和市场开发难度较大, 开发一种新药一般需要数年的时间, 而长期扎实的基础研究和生产开发又是基因工程药物研发无法省略的基本过程, 也是基因工程药物强生命力的基础。

(3) 高投入 正是由于技术含量高、研制周期长、难度大, 因而基因工程药物是一种投入相当大的产业, 每一种新产品的研究开发及厂房兴建、设备仪器配置、高级研究人员和管理人员的高薪酬金及其他各项费用, 还有产品市场开发、广告宣传等, 都需要巨额支出。目前国外研究开发一种新的生物医药市场费用大致在 1 亿~3 亿美元, 有时甚至还要高出一倍以上, 显然, 雄厚的资金支持是基因工程药物开发的必要保障。

(4) 高风险 生物医药产品的开发孕育着较大的不确定风险, 从实验室研究到上市、售后监督等一系列步骤显然是耗费巨大的系统工程, 从技术、人力、物力和资金等各方面的投入上都是如此。而任何一个环节失败都将前功尽弃, 有的药物甚至可能会在使用过程出现一些不曾料想的不良反应而需要重新评价。一般来讲, 基因工程药品的研发成功率仅有 5%~10%。长周期、大投入和不确定的市场因素又进一步增加了

难度和风险。

(5) 高收益 基因工程药物的利润回报率很高,一般新药上市后 2~3 年即可以收回投资,尤其是拥有新产品、专利产品的企业,一旦开发成功便会形成技术垄断优势,利润回报率可高达数倍以上。这也正是基因工程药物能够吸引庞大的风险资金投入的最直接原因。

随着人类基因组计划(HGP)取得的进展,21 世纪的生命科学以及医药产业取得了飞跃性的进步。HGP 能够解决肿瘤等分子遗传学问题,它的核心部分是对多种遗传疾病的致病基因和相关基因进行定位、克隆和功能鉴定,通过对每一个基因的测定,找到它的准确位置,以达到预防、诊断、治疗多种人类基因遗传病的目的,彻底改变了传统新药开发的模式。这必将促进基因工程药物、抗体工程药物、分子诊断、基因疫苗、基因治疗、基因芯片等新兴产业发展。

当前,一场以基因工程为核心的生物产业革命正在全世界兴起,我国面临重要战略机遇。2007 年 4 月国务院制定了《生物产业发展“十一五”规划》,提倡大力发展生物产业,使之成为对我国经济增长具有突破性重大带动作用的高技术产业,为全面建设小康社会进而到本世纪中叶基本实现现代化提供有力的产业支撑。《生物产业发展“十一五”规划》中明确提出以基因工程药物、抗体药物产业创新发展为核心,大力发展生物医药产业,推动治疗肿瘤、乙肝、心血管病等生物药物新产品的产业化,推动传统药物的剂型改造。形成由药物发现到应用、由研究到产业化的完整的创新药物体系。据不完全统计,中国国内目前有 300 多家单位从事生物工程研究,有 200 余家现代生物医药企业,50 多家生物工程技术开发公司。中国国内已将生物医药产业作为经济建设中的重点建设行业和高新技术中的支柱产业来发展,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。可以看出以基因工程制药为增长点的现代生物技术制药在中国的前景非常光明,是名副其实的“朝阳”产业。

三、基因工程制药的现状与前景

(一) 现状

1997 年全球生物技术药品市场份额约为 150 亿美元,之后每年保持着 12% 甚至更高的增长速度,2003 年达到 600 亿美元,占同期世界药品市场总销售额的 10% 以上。包括一系列的激素、血液因子、疫苗、单抗等,几乎都是蛋白质药物。

最初批准的许多药物都只是单纯的蛋白质,一般都通过优化重组其氨基酸序列并通过大肠杆菌、酵母、动物细胞系来表达。在未来的几年中获得批准上市的大多数蛋白质类产品仍将在这些细胞中表达。现在基于植物细胞的转基因表达系统已经出现,必将有着很大的发展潜力。

基因治疗还不尽如人意。虽然基因治疗的实验在 1990 年就开始,但效果并不理想。不但有效性不明显,很多实验还出现过安全性问题。迄今为止,全世界只有一种反义寡核苷酸 Vitravene 用于治疗艾滋病患者的巨细胞病毒视网膜炎。

在发达国家,生物医药工业已成为蓬勃发展的庞大产业,而随着生物技术的迅猛发展,生物技术产业愈来愈成为医药产业中的焦点。目前,美国和欧洲分别拥有生物技术公司 1300 家和 200 家,有人预测到 2025 年美国生物技术市场的贸易额将达到 25200 亿美元,欧洲国家在 5 年内也将达到 3360 亿美元,日本到 2010 年将达到 2080 亿美元。

但是我国生物技术水平还和国际先进水平有着一定的差距。基础研究、试验设备、人才队伍落后,资金投入不足、投资前期研究少、尚未建立起适应于知识经济时代的融资体制,

对高新技术保护不足等都是发展的重要障碍。这些障碍使得中国目前的生物医药企业多未形成专业化和规模经济,创造少,引进多。中国加入 WTO 后,知识产权保护问题和国外产品的冲击越来越严重。

我国的生物技术制药,特别是基因工程制药大都还停留在仿制的模式上,因为仿制投资少、见效快、收益高、风险低,众多厂家趋之若鹜,一哄而上,使得我国在生物制药方面呈现重复投资多,同种药物多家公司生产(如干扰素一项就有 20 多个厂家生产)的现状。可以看出,中国国内的新药开发工作缺乏重点和创新,缺乏综合协调作战的能力,重复开发现象普遍;而且,新药开发后继乏力,企业难以形成专利产品,所能获得的垄断性利润很少,一旦产品更新换代或市场出现变化,企业的生产将极为被动,根本无法适应竞争。

(二) 前景

据 Parexel's Pharmaceutical R&D Statistical Source Book 报告,已有 723 种生物技术药物正在进行 FDA 审批,还有 700 种药物在早期研究阶段(研究与临床前),有 200 种以上产品已到最后批准阶段(Ⅲ期临床与 FDA 评估)。治疗药物平均年增长 16%,诊断药物年增长 9%。

肿瘤方面:目前的医疗水平,我国仍采用早期诊断、放疗、化疗等综合手段进行治疗。今后将利用基因工程重组抗体抑制肿瘤,应用导向 IL-2 受体的融合毒素治疗 CTCL 肿瘤(皮肤 T 细胞淋巴瘤);利用基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)来抑制肿瘤血管生长,阻止肿瘤生长与转移。

治疗自身免疫性疾病方面:如类风湿性关节炎、红斑狼疮等,一些制药公司正在积极研究如何攻克这类疾病。如 Chiron 公司生产的 β -干扰素用于治疗多发性硬化病;能与 β 细胞表面抗体结合的 LJP349(一种具有抗原决定簇基因的 DNA 片段),用于治疗红斑狼疮等。

基因治疗方面:虽然现在的技术手段还没有成熟,仍有很多技术难题没有解决,但随着基因组科学的建立与基因操作技术的日益成熟,基因治疗会形成一个巨大的市场。

今后生物制药产业会大规模应用一些新的技术,如新的筛选方法、新的纯化系统等。基因治疗技术也将不断完善,一些以前难以克服的癌症和病毒性疾病都将有望被治愈。

在生物技术领域,我国虽然与世界先进水平有一定的差距(主要是重科研轻开发,研究开发领域中的“上游技术”与国际先进水平相比仅落后 3~5 年,但下游技术却至少相差 15 年以上),但是我国的起点较高,只要我们同时注重自身的科技研发和与外国的科技合作,就能在短时间内将我国的生物技术提高到一个较高的水平。目前,我国基因工程制药产业已进入快速发展时期。

第二节 基因工程药品的研发过程

基因工程制药的研发是一个复杂的过程,可分为三个阶段:第一阶段为实验室研究阶段,也称为发现性或探索性研究(discovery),属于应用基础研究阶段(research);第二阶段为产品开发阶段(development),属于应用研究阶段,与第一阶段一起统称为研发阶段,即临床前研究,就是常说的 R&D;第三阶段为商业化阶段(commercialization),是将产品推向市场的过程。这三个阶段并不是完全独立的,特别是研究和开发两个阶段没有一个明确的界限(图 1-1)。

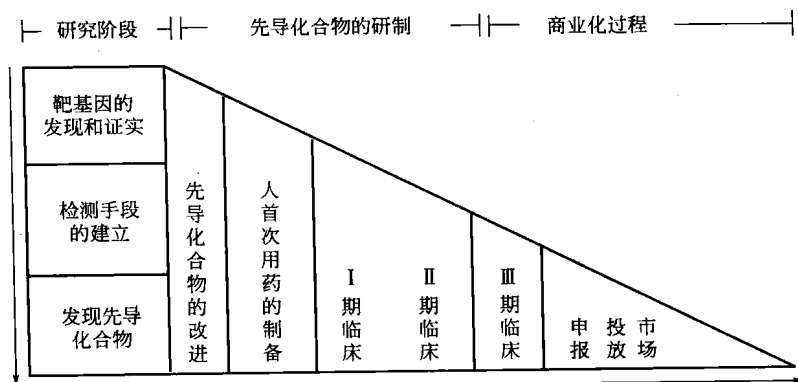


图 1-1 生物药品的研发过程

一、基因工程药品的实验室研究阶段

根据公司的研发目标不同，第一阶段的研究内容差别较大。如果目标是研发全新药物，向 Genetech、Amgen 或 Eli Lilly 这样的公司，第一阶段可能包括很多发现靶基因的研究。第二章基因工程药物设计中论述了很多发现靶基因的方法，这是一项昂贵而庞大的工程。多数生物技术公司是根据文献发表的靶基因设计药物。这一阶段的研究内容包括靶基因的发现和证实实验（target identification and validation）。整个药物研发过程好似一座金字塔，靶基因的发现和证实实验在金字塔的最底层，项目多但成功率特别低。

这些探讨性项目 90% 以上都以失败而告终，只有 5% 以下的项目能坚持到底，最终走向市场。这就是为什么研发一个药物的花费如此巨大。如果靶基因的证实过关。下一步应该对目前的研究状况、专利情况与现有药物相比的优缺点等做一个综合调查，对该生物药物的适应证（indication）、作用机理、应用前景得出结论。当这些结论获得公司董事会和相关团体通过后，便进入理论证实阶段（proof of concept）。理论证实阶段获得成功后便可列入研究计划。在研究的初级阶段，即探讨研究阶段只有生物学家参加，当列入研究计划后，公司将发动不同领域的专家参与研究，包括生物信息学专家分析和收集相关资料、细胞生物学家建立细胞膜型、生物化学专家建立表达和纯化蛋白质的方法、动物药理学和病理学专家建立动物模型，进行动物实验等，直到筛选到比较理想的可重复的先导化合物（lead generation）。至此，探索性研究结束了，研究进入开发阶段。

二、基因工程药品的开发阶段

探索研究成功后，并获得一批先导化合物，公司将会立项研究。对立项的课题公司将投入更多的人力物力。第一件事将是应用蛋白质工程方法对先导化合物进行优化处理（lead optimization）。优化的目的是提高先导化合物的药物学和药理学特性，提高药物的安全性、稳定性和药效。在竞争对手首先申请专利时，可通过优化药物来解决专利问题。优化的先导化合物在动物实验中获得满意的结果后，新药还需要进行灵长类动物体内实验。这时特别需要动物病理学和药理学家们的密切配合，对待选药物的药物学、药物代谢动力学、药效学、毒理学进行系统的研究。证明候选药物有较好的靶向生物利用度（在服用后充分吸收和易于分布或转运到作用位点）和具有一定抗代谢和排泄的能力，确保药物分子在作用位点维持足够长的时间，这些通常被称为吸收-分布-代谢-排泄（ADME），这些试验为最后剂量的确定做重要的准备。这些预临床研究必须确立在通用动物模型上产生药理学和毒理学反应所需要的剂量范围，并在器官、细胞和分子水平鉴定这些反应。国家食品药品监督管理局规定在研究

和开发阶段应完成产品的制备工艺、理化性质、纯度、检验方法、剂型、稳定性、质量标准、药理、毒理、动物药代动力学等研究。结果都符合要求，就可以考虑临床实验。在正式临床实验开始之前要在志愿者身上进行第一针人体实验（first human dose），主要观察实验药物的安全性，确保正式临床实验的顺利进行。

三、基因工程药品的临床实验

国家食品药品监督管理局发布的《药品注册管理办法》规定，药物的临床试验（包括生物等效性试验），必须经过国家食品药品监督管理局批准，必须执行《药物临床试验质量管理规范》。申请新药注册，应当进行临床试验。临床试验分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期。新药在批准上市前，应当进行Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期临床试验。经批准后，有些情况下可仅进行Ⅱ期和Ⅲ期临床试验或者仅进行Ⅲ期临床试验。Ⅰ期临床试验：初步的临床药理学及人体安全性评价试验。观察人体对于新药的耐受程度和药代动力学，为制订给药方案提供依据。Ⅱ期临床试验：治疗作用初步评价阶段。其目的是初步评价药物对目标适应证患者的治疗作用和安全性，也包括为Ⅲ期临床试验研究设计和给药剂量方案的确定提供依据。此阶段的研究设计可以根据具体的研究目的，采用多种形式，包括随机盲法对照临床试验。Ⅲ期临床试验：治疗作用确证阶段。其目的是进一步验证药物对目标适应证患者的治疗作用和安全性，评价利益与风险关系，最终为药物注册申请的审查提供充分的依据。试验一般应为具有足够样本量的随机盲法对照试验。Ⅳ期临床试验：新药上市后由申请人进行的应用研究阶段。其目的是考察在广泛使用条件下的药物的疗效和不良反应、评价在普通或者特殊人群中使用的利益与风险关系以及改进给药剂量等。

生物药品的临床试验，是检验待检药品对人体的安全性和疗效，在人体验证临床前动物实验和灵长类动物实验的结果，以证实或揭示试验药物的作用、不良反应和（或）试验药物的吸收、分布、代谢和排泄，确定该药物是否可以在临床正式应用。药物的临床试验包括各期临床试验、人体生物利用度或生物等效性试验。临床试验的最低病例数要求如下。Ⅰ期：20~30例；Ⅱ期：100例；Ⅲ期：300例；Ⅳ期：2000例。

（一）Ⅰ期临床试验

Ⅰ期临床实验的目的是初步评价待检药物的人体安全性试验及临床药理学实验，观察人体对于新药的耐受程度和药代动力学，为制订给药方案提供依据。Ⅰ期临床试验一般要求最低病例数（试验组）为20~30例。需要说明的是，对于创新药物来说，需要完成的药代动力学内容较多，某些药代动力学内容如健康人单次或多次给药的药代动力学研究、进食对口服给药制剂的影响等，需在此期完成。其他内容，如药物代谢产物的药代动力学研究、不同种族人的药代动力学研究、患者的药代动力学研究、特殊人群的药代动力学研究、血药浓度对药效动力学影响的研究、药物与药物相互作用的药代动力学研究等，需根据申报药物代谢及临床应用的特点来考虑需进行哪些药代动力学研究。

（二）Ⅱ期临床试验

治疗作用初步评价阶段，其目的是初步评价药物对目标适应证患者的治疗作用和安全性，也包括为Ⅲ期临床试验研究设计和给药剂量方案的确定提供依据。此阶段的研究设计可以根据具体的研究目的，采用多种形式，包括随机盲法对照临床试验。

Ⅱ期临床试验一般最低病例数为100例。Ⅱ期临床试验应分为两个阶段进行，第一个阶段为剂量摸索阶段，应从最小剂量开始，进行多个剂量组的临床试验，每组可应用小样本，在初步确定安全、有效的剂量后，再开始第二阶段的严格随机盲法对照Ⅰ期临床试验，本期临床试验是在初步确定不良反应的同时进一步确定该药的有效性。

随机盲法对照临床试验,是临床试验的基础,随机是指按自然规律,而不是人为地把两组病人分成A与B组,用随机方法分配病例可以消除偏倚,为了使两组病例具有可比性,随机的方法有多种,最常见的为数字表法。

盲法就是将试验组和对照组全部保密,使有关人员包括受试者、研究者、监察员、数据资料处理及统计人员,不知每个病例分配的是何种药物,其目的是减少主观因素对药物治疗结果的影响及判断。盲法又分为仅对受试者或研究者设盲的单盲;对受试者和研究者均设盲的双盲;对受试者、研究者、监察员、数据资料处理及统计人员均设盲的三盲或多盲。

在盲法的执行中,应尽可能达到双盲,即受试者和研究者都不知道每个病人所用的药物,这样才有可能避免受试者的心理因素对治疗结果的影响,避免研究者的主观因素对结果判断的干扰。由于对照药物在剂型、性状、颜色、气味等方面表现的不同而无法达到双盲者,一般可通过采取双盲、双模拟的方法,即用安慰剂分别模拟试验药与对照药,对服用试验药的病人同时服用对照药的安慰剂,服用对照药的病人同时服用试验药的安慰剂(placebo),从而达到双盲的模式。而对异形制剂难以进行模拟或有专利、刻有药名的制剂而无法达到双盲双模拟时,可以采用严格的盲法,尽量达到双盲的要求,如把试验药与对照药的外包装做成完全一致,外包装上所写文字也一致,仅有药物编号不同,发药时应有专人负责,随诊与结果判断也应专人负责,并应强调受试者不应对自己所服用药物的形状、颜色、气味等进行描述,研究者也不应向受试者询问以上情况,从而可达到相对性双盲,即严格盲法。

对照是比较药物疗效的一种方法,观察不同的治疗方案,区别治疗和非治疗之间的效应,大多数临床试验选择一组对照药,可为安慰剂,也可为阳性药。安慰剂作对照时,一般仅限于所选的适应证无有效的药物治疗,或所选的适应证比较轻不需要治疗可自愈时的情形。绝大多数药物选择阳性药物作对照。

(三) III期临床试验

治疗作用确证阶段。其目的是进一步验证药物对目标适应证患者的治疗作用和安全性,评价利益与风险关系,最终为药物注册申请获得批准提供充分的依据。III期临床试验为扩大的临床试验,试验一般应为具有足够样本量的随机盲法对照试验。III期临床试验一般最低病例数为300例。

(四) IV期临床试验

新药上市后由申请人自主进行的应用研究阶段。其目的是考察在广泛使用条件下的药物疗效和不良反应;评价在普通或者特殊人群中使用的利益与风险关系;改进给药剂量等。为标准转正和产品再注册提供更广泛的安全有效的信息,IV期临床试验最低病例数为2000例。

(五) 新药申请和上市

新药上市的程序按国家食品药品监督管理局颁发的《新生物制品审批办法》执行。新药一般在完成III期临床试验后经国家药品监督管理局批准,即发给新药证书。持有《药品生产企业许可证》并符合国家食品药品监督管理局《药品生产质量管理规范》(GMP)相关要求的企业或车间可同时发给批准文号,取得批准文号的单位方可生产新药。

参 考 文 献

- [1] Gary Walsh 主编. 宋海峰等译. Biopharmaceuticals [second edition]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 朱宝泉. 生物制药技术. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] 张淑秀. 最新药品注册实操. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.

- [4] 谭仁祥, 杨玲. 浅谈海洋药物研究与开发战略 [J]. 中国新药杂志, 2003, 9 (7): 65.
- [5] 郝捷, 冯波, 王建辰. 转基因动物研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004, 25 (1): 1.
- [6] 李思成, 温德良, 冯燕丽. 我国医药行业现状与发展趋势 [J]. 中国药房, 2003, 14 (3): 132-135.
- [7] 李思成, 温德良, 冯燕丽. 我国医药行业现状与发展趋势 [J]. 中国药房, 2003, 14 (3): 132-135.
- [8] Richert JM. News biopharmaceuticals in the USA. Trends in development and marketing approvals 1995-1999. Feature, 2000, 18: 364.

第二章 基因工程制药

第一节 制药基因的克隆

制药基因的克隆是指应用基因工程技术手段得到制药基因的过程。克隆制药基因所涉及的基因工程技术大体上分为：①制药基因的获得；②制药基因与载体分子的体外连接反应；③将该人工重组 DNA 分子导入到能够正常复制的宿主细胞中进行扩增；④阳性重组子的筛选和鉴定；⑤重组子的表达以及蛋白的纯化五大步骤。

一、制药基因的获得

制药基因获得的方法一般分为直接获得法和间接获得法。一般来说，所谓的直接获得法是指直接从基因组 DNA 中获得制药基因；而间接获得法要先获得 mRNA、cDNA 等，间接从基因组 DNA 中获得制药基因。由于原核生物基因组相对于真核生物基因组来说，结构相对比较简单、长度较短、数量较少，所以应用直接获得法（如直接分离制药基因、鸟枪法）即可获得原核生物的基因。然而，真核生物基因组不仅庞大，而且结构复杂，分离时还要尽量排除内含子，所以，应用间接分离法从 cDNA 文库克隆制药基因和应用 RT-PCR 法获得制药基因，以其操作简单，能最大限度地排除内含子的干扰等优点越来越被广泛应用。

（一）从 cDNA 文库克隆制药基因

此种方法首先要构建 cDNA 文库。cDNA 文库代表生物某一特定器官或组织在某一特定的发育时期，细胞内转录水平上的基因群体。因为基因组含有的基因在特定的组织细胞中只有一部分表达，而且处在不同的环境条件、不同分化时期，故基因表达的种类和强度也不尽相同，因此 cDNA 文库具有组织特异性。

cDNA 文库的构建是以生物细胞的 mRNA 为模板，在逆转录酶的作用下合成 cDNA 的第一条链，然后再合成双链 cDNA，并将合成的双链 cDNA 重组到质粒载体或噬菌体载体上，导入大肠杆菌宿主细胞进行增殖。由 mRNA 逆转录得到的 cDNA 是已不再含有内含子的序列。

一般我们获得材料后，第一步是分离细胞总 RNA，然后从中纯化出 mRNA。我们知道每一种 mRNA 分子的 3' 末端都含有一段 poly (A) 尾巴，这种结构为从细胞总 RNA 中纯化出 mRNA 提供了十分方便的途径。即当细胞总 RNA 制剂通过已经用 oligo (dT) 处理过的纤维素柱时，mRNA 分子的 poly (A) 尾巴便会同 oligo (dT) 序列杂交并吸附到柱子上，然后用洗脱液洗脱即可获 mRNA。

1. cDNA 第一链的合成

在逆转录过程中，cDNA 的第一链及第二链的合成是这个技术成败的关键。合成 cDNA 第一链有三种方法。

(1) oligo (dT) 引导的 cDNA 合成法 是利用 mRNA 具有 poly (A) 尾巴的特性，用 oligo (dT) 作为引物，引导逆转录酶按 mRNA 模板合成第一链 cDNA，这种反应产物是一种 DNA-RNA 杂交分子，最后 RNA 可被 RNaseH 分解而剩下第一链 cDNA，如图 2-1 所示。但是，应用 oligo (dT) 引导 cDNA 合成的缺点是：它必须从 3' 末端开始，因为反转录

酶无法到达 mRNA 分子的 5' 末端, 这对于大分子量的、较长的 mRNA 分子而言, 是一个特别麻烦的问题。

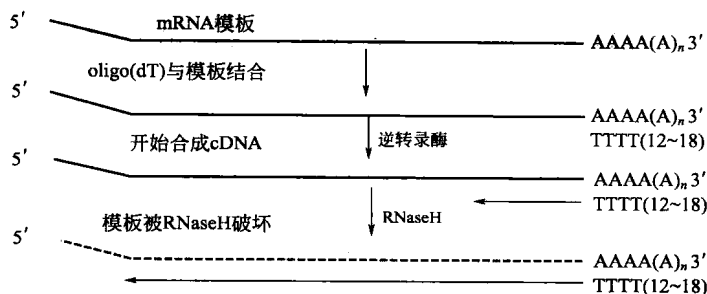


图 2-1 oligo (dT) 引导的 cDNA 第一链合成法

(2) 随机引物引导的 cDNA 合成法 为了克服 oligo (dT) 引导 cDNA 合成法的缺点, 现在已经发展出了第一链 cDNA 合成的第二种方法, 叫做随机引物引导的 cDNA 合成法 (randomly primed cDNA synthesis)。此法的基本原理是随机合成 6~10 个寡聚核苷酸片段, 作为合成第一链 cDNA 的引物, 在应用这种混合引物的情况下, cDNA 的合成可以从 mRNA 模板的许多位点同时发生, 而不仅仅从 3' 末端的 oligo (dT) 引物处开始, 可解决 3' UTR 过长或 RNA 降解问题。

(3) 基因特异性引物引导的 cDNA 合成法 当 RNA 序列或部分序列已知时, 可以通过设计基因特异性引物, 在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链。

2. cDNA 第二链的合成

合成第二链 cDNA 的方法有两种, 第一种叫做自我引导合成法 (self priming), 如图 2-2 所示。这种方法的基本原理就是用 RNaseH 消化 mRNA 模板, 从而导致第一链 cDNA 的解离, 并在其末端形成一个发夹结构 (loop), 有关形成此种结构的分子机理目前尚不清楚, 一般认为可能是由于逆转录酶转弯效应所致。这种发夹环结构可作为第二链 cDNA 合成的引物, 在 Klenow 片段的作用下合成一个完整的第二链, 这种发夹环结构可用 S1 核酸酶切割除去。但是这种切割作用也具有很多缺点, 比如导致许多的 cDNA 序列被切割掉, 这样得到的 cDNA 克隆丧失了 mRNA 5' 端的许多信息, 而且 S1 核酸酶还有可能破坏所合成的 cDNA 双链分子。

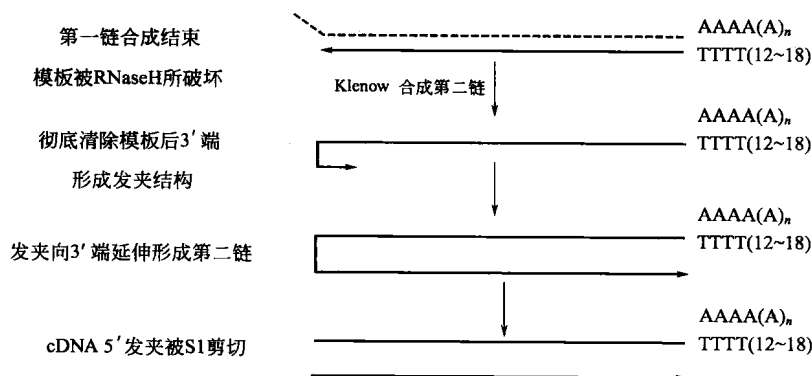


图 2-2 cDNA 第二链的自我引导合成

第二种合成第二链 cDNA 的方法是大肠杆菌 RNaseH 酶降解取代法 (replacement syn-