



CHANYE ZHUANLI
FENXI BAOGAO

产业专利分析报告

(第2册)

杨铁军◎主编

1. 基因工程多肽药物
2. 环保农药



知识产权出版社
全国百佳图书出版单位





CHANYE ZHUANLI
FENXI BAOGAO

产业专利分析报告

(第2册)

杨铁军◎主编

1. 基因工程多肽药物
2. 环保农药



知识产权出版社
全国百佳图书出版单位



内容提要

本书收集了两个行业的专利态势分析报告。每个报告从相关行业的专利（国内、国外）申请、授权、申请人的已有专利状态、其他先进国家的专利状况、同领域领先企业的专利壁垒等方面入手，充分结合相关数据，展开分析，并得出分析结果。本书是了解相关行业技术发展现状并预测未来走向，帮助企业做好专利预警的必备资料。

读者对象：相关行业的企业管理者、研发人员、知识产权预警及管理的研究人员。

责任编辑：王 欣 卢海鹰

责任校对：韩秀天

版式设计：王 欣 卢海鹰

责任出版：卢运霞

文字编辑：胡文彬

图书在版编目（CIP）数据

产业专利分析报告．第2册／杨铁军主编．—北京：知识产权出版社，2011.7
ISBN 978-7-5130-0730-6

I. ①产… II. ①杨… III. ①专利—研究报告—世界 IV. ①G306.71

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2011）第 155419 号

产业专利分析报告（第2册）

CHANYE ZHUANLI FENXI BAOGAO

杨铁军 主 编

出版发行：知识产权出版社

社 址：北京市海淀区马甸南村1号

邮 编：100088

网 址：<http://www.ipph.cn>

邮 箱：bjb@cnipr.com

发行电话：010-82000860 转 8101/8102

传 真：010-82005070/82000893

责编电话：010-82000860 转 8122

责编邮箱：wangxin@cnipr.com

印 刷：知识产权出版社电子印制中心

经 销：新华书店及相关销售网点

开 本：787mm×1092mm 1/16

印 张：15.5

版 次：2011年9月第1版

印 次：2011年9月第1次印刷

字 数：360千字

定 价：36.00元

ISBN 978-7-5130-0730-6/G·421 (3640)

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题，本社负责调换。

编委会

主 任：杨铁军

副主任：葛 树 冯小兵

编 委：李永红 张清奎 崔伯雄 朱仁秀

张伟波 闫 娜 韩爱朋 王贞华

李超凡

序

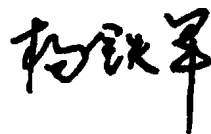
有效地利用专利信息是提高创新水平、把握市场方向的重要途径，是避免专利纠纷、规避经营风险的有效手段，是提高经济增长质量和效益的保障。当前，作为市场主体，企业和行业对专利信息利用的认识正在不断深化，专利信息利用的市场需求逐步扩大，知识产权中介服务机构的信息服务能力与水平亟需大力提升。因此，为提升专利信息在产业发展中的作用，促进专利信息服务产业的发展，政府部门有必要发挥引导、示范和推动作用，以充分发挥专利制度在国民经济发展中的作用。

2010 年国家知识产权局组织开展了专利分析普及推广项目。该项目的内容包括：定期开展涉及多个产业的专利分析课题研究，发布产业专利分析报告，推广专利分析成果；形成专利分析报告标准，规范专利分析内容，普及专利分析方法。通过这些工作的开展，我们力图实现“普及方法、培育市场、服务创新”的项目宗旨。“十二五”期间，国家知识产权局计划每年开展涉及不同产业的近 10 项专利分析课题研究，共计形成近 50 项专利分析报告。我们期待着这些报告在培育和规范专利分析市场，提升专利信息运用的意识和能力，引导技术创新和专利运用方面能够发挥重要支撑作用。

2010 年度，国家知识产权局专利分析普及推广项目共开展了 5 项专利分析研究，包括薄膜太阳能电池、等离子体刻蚀机、生物芯片、环保农药、基因工程多肽药物。经过课题组成员的辛勤努力，形成了一组具有一定参考价值和示范作用的专利分析报告，并将这些分析报告公开出版。由于报告中专利文献数据采集范围和专利分析工具的限制，加之研究人员能力有限，报告的数据、结论和建议仅供社会各界借鉴参考。

我衷心希望本书对于相关行业、企业和地方知识产权管理部门以及知识产权服务机构开展专利分析工作发挥有益作用，并祝愿专利分析工作在我国各产业、各地区结出累累果实！

国家知识产权局副局长

Handwritten signature in black ink, reading "陈义中" (Chen Yizhong).

2011 年 9 月

目 录

报告一 / 基因工程多肽药物专利分析报告 / 1

第1章	研究概况 / 3
1.1	相关概念 / 3
1.2	研发现状 / 4
1.3	产业前景 / 13
1.4	研究方法 / 15
第2章	激素类多肽药物专利态势分析 / 18
2.1	激素类多肽药物专利文献的总体信息分析 / 18
2.2	激素类多肽药物重点品种——胰岛素的专利信息分析 / 30
2.3	本章重要分析结论 / 48
第3章	细胞因子类多肽药物专利态势分析 / 51
3.1	细胞因子类多肽药物专利文献的总体信息分析 / 51
3.2	细胞因子类多肽重点品种——白细胞介素2的专利信息分析 / 60
3.3	细胞因子类多肽重点品种——干扰素 α 的专利信息分析 / 75
3.4	本章重要分析结论 / 92
第4章	溶血栓类多肽药物专利态势分析 / 94
4.1	溶血栓类多肽药物专利文献的总体信息分析 / 94
4.2	溶血栓类多肽药物重点品种——组织型纤溶酶原激活剂的专利信息分析 / 105
4.3	本章重要分析结论 / 129
第5章	主要结论 / 131
5.1	基因工程多肽药物发明专利申请总体态势 / 131
5.2	基因工程多肽药物领域专利申请区域分布态势 / 131
5.3	重点多肽药物品种的重要申请人和多边专利申请现状 / 132
附 录	/ 134

报告二 / 环保农药专利分析报告 / 139

第1章	研究概况 / 141
1.1	立题背景 / 141
1.2	研究目的 / 141
1.3	研究对象 / 142
第2章	专利技术分析 / 145
2.1	环保农药技术总体分析 / 145
2.2	农药原药 / 153
2.3	农药混剂 / 155
2.4	农药剂型 / 156
2.5	生物农药 / 157
2.6	重要专利分析 / 159
2.7	小结 / 172
第3章	主要申请人分析 / 175
3.1	主要申请人总体分析 / 175
3.2	拜耳公司 / 182
3.3	小结 / 189
第4章	中国市场环保农药专利分析 / 191
4.1	中国市场专利技术分析 / 191
4.2	申请人分析 / 203
4.3	小结 / 213
第5章	美国市场环保农药专利分析 / 215
5.1	环保农药专利技术总体分析 / 215
5.2	农药原药 / 218
5.3	农药混剂 / 220
5.4	农药剂型 / 221
5.5	生物农药 / 222
5.6	小结 / 225
第6章	主要结论及建议 / 226
6.1	主要结论 / 226
6.2	建议 / 227
附录	附录 / 229
	附件1: 术语说明 / 229
	附件2: 参考文献 / 230
	附件3: 环保农药技术介绍 / 231
	附件4: 各主要市场环保农药相关政策 / 232
	附件5: 农药产业概况 / 234

报告一

基因工程多肽药物 专利分析报告

课 题 名 称：基因工程多肽药物专利分析

承 担 部 门：医药生物发明审查部

课 题 负 责 人：张清奎

课 题 组 长：曾繁辉

课题研究人员：贾书瑾 曾繁辉 郭晓勇 王国臻

潘俊宇 赵 硕 李振鹏 吴汀晨

主 要 执 笔 人：李振鹏 潘俊宇 赵 硕 郭晓勇

吴汀晨 曾繁辉

统 稿 人：张清奎 贾书瑾 曾繁辉 赵 硕

研 究 时 间：2010 年 7 ~ 12 月

课题研究合作单位：

北京大学北大—未名生物技术联合实验室

第1章 研究概况

基因工程兴起于20世纪70年代初。1972年Berg P.和他的同事将 λ 噬菌体基因和大肠杆菌乳糖操纵子插入猴病毒SV40 DNA中,首次构建出DNA的重组体。第二年,Cohen S.和Boyer H.将细菌质粒通过体外重组后导入宿主大肠杆菌细胞内,得到基因的分子克隆,由此产生了基因工程。基因工程技术的迅速发展不仅使医学基础学科发生了革命性的变化,也为医药工业发展开辟了广阔的前景。以DNA重组技术为基础的基因工程技术改造和替代了传统医药工业技术,已成为重要的发展方向,并已经广泛应用于生理活性物质的基因工程表达和改造、抗生素及其他药用化合物生产菌株的遗传改良、基因工程疫苗和抗体的制备,以及基因治疗载体的构建等众多领域。

基因工程药物主要是指利用DNA重组技术生产以前由于材料来源困难或制造技术问题无法生产的药物,其中基因工程方法重组表达的生理活性多肽物质是基因工程药物的重要组成部分。目前进入市场的主要基因工程多肽类药物包括胰岛素、人生长激素等激素类药物;干扰素、白介素、集落刺激因子等细胞因子类药物以及重组链激酶、重组组织型纤溶酶原激活剂等溶血栓类药物等。

本章将对基因工程多肽类药物的相关概念、研发现状、产业前景和专利分析方法等作一概述。

1.1 相关概念

1.1.1 基因工程

基因工程是对携带遗传信息的分子进行设计和施工的分子工程,包括基因重组、克隆和表达。基因工程这个术语既可以用来表示特定的基因施工项目,也可泛指它所涉及的技术体系,其核心是构建DNA重组体的技术,因此基因工程和DNA重组技术有时也就成为同义词。

过去分离一个基因、测定基因的序列、确定基因的功能,用以改变生物性状,都是十分困难的事情,往往需要数年甚至数十年的时间,现在利用基因工程技术,任何生物实验室都能在短时间内完成。获得目的基因后,通过将其限制性酶切片段插入克隆载体,导入原核或真核宿主细胞,进行基因改造和表达,能够大规模生产生物体内微量存在的活性物质。

1.1.2 基因工程多肽类药物

1977年,Itakura K.和Boyer H.在大肠杆菌中产生下丘脑激素十四肽生长素释放

抑制激素。该激素可用于治疗儿童发育时期因生长素分泌过多造成的四肢巨大症。从1L工程菌发酵液中可得到50mg的基因表达产物，相当于50万头羊下丘脑提取的该激素，由此可以了解基因工程产业化的意义。

基因工程药物大体上经历了三个阶段：第一阶段是把编码药用多肽的基因导入大肠杆菌等细菌中，通过大肠杆菌等表达该药用多肽，但这类药物往往有缺陷，人类的基因在低等生物的细菌中往往不表达或表达的多肽没有生物活性。第二阶段是人们用哺乳动物的细胞代替细菌，生产第二代基因工程多肽类药物。但由于哺乳动物细胞培养条件相对苛刻，生产的药物成本居高不下。目前，第一、第二代基因药物的研制和生产已经成熟。第三阶段是到了20世纪80年代中期，随着基因重组和基因转移技术的不断发展和完善，科学家可以将人们所需要的药用多肽的基因导入到哺乳动物体内，使目的基因在哺乳动物体内表达，从而获得药用多肽。这种携带外源基因并能稳定遗传的动物，我们称之为“转基因动物”。由于从哺乳动物乳汁中获取的基因药物产量高、易提纯，因此利用乳腺分泌出的乳汁生产药物的转基因动物被称为“动物乳腺生物反应器”。20世纪90年代中后期，国际上用转基因牛、羊和猪等家畜生产贵重药用多肽的成功实例已有几十种，一些从转基因动物乳汁中分离的药物正用于临床试验。

以上述基因工程方法生产的生理活性多肽物质是基因工程药物的重要组成部分，对于这类基因工程药物可统称为“基因工程多肽类药物”。基因工程多肽类药物主要包括激素类药物、细胞因子类药物以及溶血栓类药物三大类。

当然，基因工程药物并不局限于上述多肽类药物，基因工程疫苗、基因工程抗体药物和基因治疗载体也同样属于基因工程药物的范畴，但限于篇幅和本课题设定的研究方向，本章将仅对这三类基因工程多肽类药物的研发现状进行介绍。

1.2 研发现状

1.2.1 重组激素类药物

激素是机体产生的一种最重要的调节分子，其最初定义是机体的特定腺体合成并释放的一种物质，通过与敏感细胞内部或表面的受体相互作用而使靶细胞发生变化。自1972年DNA重组技术诞生以来，已有包括胰岛素、人生长激素以及胰高血糖素样肽等在内的多种重组激素作为治疗药物应用于临床，此外还有例如胰岛素样生长因子（insulin-like growth factors, IGFs）等多种重组激素药物正在研发。

1.2.1.1 胰岛素（Insulin）类药物

胰岛素是由胰腺B细胞分泌的由51个氨基酸残基组成的多肽激素，主要用于调节糖代谢。1921年，Banting和Best首次从狗的胰腺中成功获得了胰岛素，并于第二年就应用于注射治疗糖尿病。^①

成熟的胰岛素由两个二硫键连接的A链和B链组成，A链有21个氨基酸残基，B

① BLISS M. The Discovery of Insulin [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1982.

链有 30 个氨基酸残基。胰岛素原是胰岛素的前体, 其中 A 链和 B 链通过 C 肽相连。

猪胰岛素与人胰岛素的氨基酸组成最相近, 差别在于猪胰岛素 B 链第 30 个氨基酸是丙氨酸, 而人则是苏氨酸。动物胰岛素曾在糖尿病治疗中发挥重要作用, 但由于生物种属的不同, 动物胰岛素与人胰岛素在氨基酸结构上存在差异, 可能导致患者的免疫反应, 其副作用给患者带来极大痛苦。DNA 重组技术的出现为利用微生物生产人胰岛素铺平了道路。1979 年, 美国基因泰克公司 (GENETECH INC) 的 Goedell 等报道了化学合成的人胰岛素基因在大肠杆菌中的表达。^① 1982 年, 美国 FDA 批准基因工程人胰岛素 Humulin 上市, 其作为首个重组蛋白质药物载入史册。

当前常用的人胰岛素表达系统主要是大肠杆菌表达系统和酵母表达系统。大肠杆菌是一个高效的表达系统, 然而表达产物往往形成包涵体, 须变性和重新折叠才能得到有活性的胰岛素。Tikhonov R. V. 等摸索出一套简化的重折叠重组人胰岛素原的方法, 在预先氧化或还原半胱氨酸残基的情况下, 用含有 10mM 巯基乙醇的 8M 尿素溶解包涵体, 通过中性弱疏水吸附剂去除疏水的细胞组分, 可溶部分经过 5 倍稀释加入 0.3mM 胱氨酸作用下重排二硫键。核酸和细胞杂质不会影响重折叠效率。重折叠的重组人胰岛素原通过金属螯合柱纯化并经过两步酶切转化为胰岛素。^② Gusarova V. D. 等人通过尝试不同的缓冲体系、不同的 pH、不同的还原剂、不同的变性剂以及不同的复性过程中的氧化还原对溶解重组人胰岛素原包涵体优化出一套工业生产重组人胰岛素原的方法。^③ 陈阳等人对大肠杆菌表达的重组人胰岛素原包涵体蛋白的变性复性条件进行了优化。考察了变性液中 DTT 的浓度、复性液的 pH 值、还原型谷胱甘肽 (GSH) 与氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的物质的量比、甘氨酸 (Gly) 浓度对复性的影响, 结果表明, 在变性液中加入 60mmol/L DTT, 复性液 pH9.5, GSH 与 GSSG 物质的量比为 5:1, Gly 浓度为 50mmol/L 条件下复性率最高, 复性后重组人胰岛素原过 DEAE-Sephrose FF 柱, 经过 TPCK-胰蛋白酶和羧肽酶 B 酶切后, 再过 Sephadex G-25 柱, 得到纯度较高的重组人胰岛素, 目的蛋白收率为 96mg/g 干菌体。^④

在酵母中, 二硫键可以正确配对从而形成正确折叠的产物。丹麦的诺和诺德 (Novo Nordisk) 公司用酿酒酵母表达一种胰岛素单链前体, 在前体中 B1 ~ B29 通过甘-甘-赖三肽和 A1 ~ A21 相连接。^⑤ 人们还使用毕赤酵母表达人胰岛素。甲醇酵母是一类可以用甲醇作为唯一碳源的非常规酵母, 毕赤酵母是其中一种, 它继承了酿酒酵母的许多优点。Xie T. 等人使用毕赤酵母的分泌表达重组人胰岛素原, 将合成的胰岛素原插入质粒 pPIC9K 中得到分泌表达质粒, 转化毕赤酵母 GS115 并筛选高表达菌

① GOEDEL D. V., et al. Expression in *E. coli* of chemically synthesized genes for human insulin [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76 (1): 106-110.

② TIKHONOV R. V., et al. Recombinant human insulin: X-1 simplification of folding of the biotechnological precursor of recombinant human insulin [J]. *Russian Journal Of Bioorganic Chemistry*, 2008, 34 (1): 56-59.

③ GUSAROVA V. D., et al. Optimization of the Industrial Production of the Recombinant Precursor of Human Insulin, *Russian Journal Of Bioorganic Chemistry*, 2009, 35 (4): 461-468.

④ 陈阳, 陈劲春. 重组人胰岛素的体外复性纯化 [M]. 北京化工大学学报, 2009, 36 (1): 77-80.

⑤ ThIM L., et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast, [J] *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 3 (18): 6766-6770.

株，在 16L 发酵桶中重组人胰岛素原的产量是 3.6g/L，通过一次色谱纯化的人胰岛素原通过转肽作用转化成胰岛素，转化率高达 70%，体内实验显示重组人胰岛素活性为 28.8U/mg。^①

人们还通过将天然胰岛素上的一个或几个氨基酸更改产生活性更好或作用时间更长的胰岛素。^② 2005 年重组人胰岛素的销售额至少达 75 亿美元，表 1-2-1 为几种已经投入市场的主要胰岛素类药物。

表 1-2-1 已经投入市场的主要胰岛素类药物

药品名	表达菌	是否突变	特性
Humulin	大肠杆菌	否	
Humalog	大肠杆菌	B28Lys 与 B29Pro 互换	速效
Lantus	大肠杆菌	A21Gly 代替 A21Gly，B 链 C 末端添加两个 Arg	长效
Novolog	baker 酵母	B28Asp 代替 B28Pro	速效

以逆转录病毒作为载体的基因治疗较为广泛，并已在一系列动物实验中取得成功。赵彦冰等人通过向糖尿病大鼠腹腔注入含有人胰岛素基因的重组质粒，观察到患病大鼠血糖水平和体重的明显改善以及胰岛素分泌水平的明显提高。^③

随着生活水平的提高，全球糖尿病发病率有上升的趋势，基因重组胰岛素类产品的年销售额已经超过 50 亿美元，成为除 EPO 和抗体类药物外的第三大类生物技术药物。

此外，胰高血糖素样肽-1（GLP-1）是一种肠促胰岛素，近年来成为糖尿病治疗领域的研究热点，受到广泛关注。^④ 2005 年 4 月，美国 FDA 已批准 GLP-1 受体激动剂 EXENATIDE 用于 II 型糖尿病的治疗。

1.2.1.2 重组人生长激素（rhGH）类药物

生长激素是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种含 191 个氨基酸的单一肽链的蛋白质激素，其分泌受下丘脑的生长激素释放激素及生长抑素的调节，是一种具有广泛生理功能的生长调节素，^⑤ 适应症是生长激素缺陷、发育障碍和 AIDS 相关耗竭病。

1957 年，Raben 首次从垂体中分离出人生长激素并用于临床垂体性侏儒症。^⑥ 1979 年，基因工程技术的应用使重组人生长激素的大规模生产成为可能，最初合成的大肠杆菌源性重组人生长激素具有与天然人生长激素相似的生物学特性，但在 N 端多

① XIE T. , et al. Secretory expression of insulin precursor in Pichia pastoris and simple procedure for producing recombinant human insulin [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology , 2008 , 38 (3) , pp. 308 -317.

② 薄涛，等．糖尿病治疗药物的研究进展 [J]．天津医科大学学报，2005，11（1）：37-44.

③ 赵彦冰，等．重组人胰岛素基因质粒对糖尿病大鼠治疗效能的研究 [J]．辽宁医学杂志，2009，23（1）：116-118.

④ ESTALL JL, et al. Glucagon and gulgagon-like peptaide receptors as drug target [J]. cyrr pharm des, 2006（12）：1731-1735.

⑤ 陈蓓，等．人生长激素研究进展 [J]．生物学杂志，2004，21（1）：9-11.

⑥ BRIAN C. , et al. Dimerization of Human Growth Hormone by Zinc [J]. Science, 1991，253（5019）：545-548.

了一个蛋氨酸，容易引起免疫反应。^① 1987 年，第一个 N 端去除蛋氨酸的重组人生长激素 Protropin 由美国基因泰克公司研制成功，此后，陆续有 Somatrem、Somatropin、Saizen 以及 SOMAVERT 等多种重组人生长激素批准上市，其 2005 年的销售总额约为 13 亿美元。

目前，市场上使用的产品大部分都是 191 肽的大肠杆菌源性重组人生长激素，然而，用大肠杆菌表达容易形成包涵体，需要通过变、复性操作，工艺复杂，活性低。朱振洪为了获得重组人生长激素在毕赤酵母中高表达的菌株，按毕赤酵母基因密码子偏爱性，人工合成 rhGH 的全基因序列，该基因被克隆到穿梭质粒 pPIC9K 中，PEG1000 介导转入毕赤酵母 GS115 细胞，通过 G418 筛选获得高拷贝转化子。在甲醇的诱导下，实现了 rhGH 在毕赤酵母中的成功表达。通过发酵条件的优化，发酵上清中的表达量达 1 537mg/L。经过超滤和两步层析，重组蛋白的得率达 35%，纯度为 97%，相对分子质量测定表明重组蛋白的相对分子质量与理论值相近，N-端氨基酸测序证实 rhGH 基因在毕赤酵母中获得正确的表达。^② 王鹏等人摸索了用毕赤酵母发酵人生长激素的发酵条件，通过单因素分析和正交实验法优化高密度发酵培养基和诱导条件，根据优化结果指导发酵罐发酵，得到改良 BSM 培养基的最佳配比为 30g/L 甘油、14g/L 酵母粉、13g/L K_2SO_4 、11g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.3g/L $CaSO_4$ 、4.4mL PTM1、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=6.5)，得到摇瓶培养最佳诱导条件为种龄 24h，诱导时间 30h，甲醇浓度 2%，pH6.3~6.9。瑞士 Bioengineering 公司 L1523 型发酵罐发酵结果显示，细胞光密度 (OD600) 达到 294，表达量最高达到 0.54g/L。^③ Lan、Hanglian 等利用昆虫杆状病毒在蚕蛹中表达了重组人生长激素 BmrhGH，表达量比幼虫表达系统高 5 倍。给小鼠口服 4.5mg/天剂量的 BmrhGH，可以观察到小鼠体重、肝重以及骺宽均有明显改变，表明 BmrhGH 有望成为一种口服蛋白质药物。^④

重组人生长激素的大规模生产使其临床适应证从最初的预防和治疗生长激素缺乏儿童的矮小症，扩展到促进先天性卵巢发育不全综合征 (Turner 综合征) 和慢性肾脏病 (chronic kidney disease) 患儿生长，再到烧伤、脓毒症和急性胰腺炎，其临床适应证还在不断扩展中。

此外，胰岛素样生长因子是一类多功能细胞增殖调控因子，在细胞的分化、增殖、个体的生长发育中具有重要的促进作用。1957 年 Salmom 和 Daughaday 首先发现正常大鼠的血清可以明显促进 35S 硫酸盐进入培养的软骨细胞，而垂体切除大鼠的血清没有这种作用，在培养基中加入生长激素 (GH) 没有这种作用，这说明正常血清中含有某种能促进细胞生长的因子。^⑤ 研究表明，血清中的这种因子具有与胰岛素类似的结构和

① BRETT A., JOHNSON et al. Formation of isoaspartate at two distinct sites during in vitro aging of human growth hormone [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264 (24): 14262-14271.

② 朱振洪, 等. 利用毕赤酵母系统表达重组人生长激素的研究 [J]. 生命科学研究, 2009, 13 (1): 20-24.

③ 王鹏, 等. 重组人生长激素在毕赤酵母中的表达研究 [J]. 西安工程大学学报, 2008, 2 (2): 161-165.

④ B. LAN, HANGLIAN, et al. In Vivo Bioassay of Recombinant Human Growth Hormone Synthesized in B. mori Pupae [J]. The Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010, Article No. 306462.

⑤ SALMON W. D., et al. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro [J]. Lab Clin Med, 1957, 49 (6): 825-836.

功能,并且其功能不受抗胰岛素血清的抑制,后来对该细胞因子进行了分离纯化和氨基酸序列分析,并于1978年正式命名为胰岛素样生长因子,包括IGF-1和IGF2。^①目前对IGF-1的研究已进入临床应用阶段,人们正在探索IGF-1对新生幼仔肠道发育的积极促进作用以及对人的糖尿病、运动神经元损伤、肠道疾病、伤口愈合以及生长激素不敏感症等疾病中所起的治疗作用及其机理。^②

1.2.1.3 其他重组激素类药物

已经上市的其他重组激素类药物还包括用于治疗不孕症的促滤泡素- β (follitropin β , 药品名 Follistim)、促滤泡素- α (follitropin α , 药品名 Gonad-F) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, 药品名 Ovidrel), 用于治疗低血糖症的胰高血糖素 (Glucagon, 药品名 GlucaGen), 以及用于诊断和治疗甲状腺癌的促甲状腺素 (thyrotropin, 药品名 Thyrogen) 和用于治疗骨质疏松的甲状旁腺激素 1-34 (Teriparatide, 药品名 FORTEO) 等。

1.2.2 重组细胞因子类药物

细胞因子 (cell factor) 又名细胞素 (cytokines), 由体内免疫细胞产生和分泌, 能影响诸多其他细胞, 或促进血细胞生成、分化与增殖, 是具有多种生物活性的多肽或低分子量糖蛋白。作为机体免疫、应答效应分子和各细胞间信息传递网络的中介, 细胞因子在机体受到内外环境刺激时, 可发挥多种生物效应。细胞因子是具有广泛生物活性的多肽物质, 作为特异性免疫和非特异性免疫的蛋白质介质, 在调节炎症、增强机体免疫功能和防止肿瘤生长等方面发挥重要功能。一般难以大量获取体内含量甚微的细胞因子来满足病人的临床治疗应用需求。DNA 重组技术使生产和提供大量高度纯化的细胞因子成为可能, 一些细胞因子得以商品化生产, 如重组人白细胞介素 2, 重组人干扰素 α 等。^③ 重组细胞因子药物是迄今开发最成功的基因工程药物之一, 目前已有包括干扰素 (IFN)、集落刺激因子 (CSF)、促红细胞生成素 (EPO)、白细胞介素 (IL) 在内的多种药物被批准上市, 年产值高达数十亿美元。

1.2.2.1 干扰素类药物

干扰素是在病毒、细菌及其产物等刺激下, 由免疫及免疫相关细胞产生的一类具有广谱抗病毒活性的糖蛋白,^④ 其具有免疫调节, 抑制细胞分裂和抗肿瘤等多种生物学活性。FDA 已批准将干扰素用于治疗 14 种以上的恶性肿瘤的辅助治疗。目前, 市场上的主要干扰素类药物如表 1-2-2 所示。

① DAUGHADAY W. H., et al. On the nomenclature of somatomedins and insulin-like growth factors [J]. Clin endocrinol Metab, 1987 (65): 1075.

② BALLARD F. J., et al. A truncated form of insulin-like growth factor 1 [J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1996, 28 (10): 1085-1087.

③ 詹正嵩, 等. 细胞因子临床应用进展 (上篇): 白细胞介素 (简称: 白介素) [J]. 引进国外医药技术与设备, 1998, 4 (1): 106-112.

④ ROBERTS R., et al. The evolution of the type I interferons [J]. Journal of Interferon and Cytok Research, 1998 (18): 805-816.

表 1-2-2 市场上主要的干扰素类药物

药品名	表达菌	结构特点	适应症
Infergen	大肠杆菌	对天然 IFN- α 各个位置 常出现氨基酸进行组合	HCV 感染等
Rofenron-A	大肠杆菌	天然 IFN- α 2a	慢性髓性白血病等
IntronA	大肠杆菌	天然 IFN- α 2b	卡波西肉瘤等
Avnoex	中国仓鼠卵巢细胞	天然 IFN- β 1a	间歇复发性硬化症等
Betaseron	大肠杆菌	IFN- β 1b, 17 位 S 取代 C	间歇复发性硬化症等

目前,最常用的重组干扰素表达系统还是大肠杆菌表达系统。朱筠等通过培养重组大肠杆菌 BL21 (pBAI) 表达人干扰素 α 2b (Human Interferon α 2b, hIFN- α 2b)。hIFN- α 2b 表达由 PL 启动子控制,通过升温至 42℃ 诱导表达,比较了分批培养和多种补料分批培养方式下 hIFN- α 2b 的生产,其中通过恒速流加葡萄糖, hIFN- α 2b 的表达量达到 6 540mg/L,平均生产速率和比速率分别为 546mg/(L·h) 和 27mg/(g·h)。升温前 1.5h 补充 25g 酵母提取物,并以 0.27g/(g·h) 的比速率供应葡萄糖, hIFN α 2b 的平均生产速率达到 1 006mg/(L·h),比生产速率为 54mg/(g·h),对有机氮源的得率提高到 138mg/g。^① 罗琪等考察了大肠杆菌 E. coli 表达的重组人干扰素 α 2b 和胸腺肽 α 1 融合蛋白包涵体的变性、复性及融合蛋白的分离纯化过程。实验结果表明:包涵体经 7mol/L 盐酸胍、10mmol/L DTT 变性;1mol/L 尿素、2mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.2mmol/L 氧化型谷胱甘肽脉冲加样稀释复性;金属螯合层析收集 0.3mol/L 咪唑洗脱峰,冷干后经重组肠激酶 30℃ 酶切 24h、Sephadex G250 柱纯化,可得到纯度达 90% 的重组人干扰素 α 2b 和胸腺肽 α 1 融合蛋白,且最终目的融合蛋白产量达 68mg/g 干菌体。^② Semikhin A. S. 等在大肠杆菌细胞中克隆融合基因,所述融合基因由编码 DBD 的右旋糖苷结合结构域的 DNA 片段、编码重组人干扰素 β 的 DNA 片段以及位于它们之间的编码人肠激酶水解识别位点的核苷酸序列组成。构建能够产生 DBD-INF- β 嵌合蛋白的有效菌株,所述蛋白质包括 INF- β 、10 个交替的甘氨酸和丝氨酸残基的间隔、人肠激酶识别位点以及右旋糖苷结合结构域。DBD-INF- β 嵌合蛋白通过固定有人肠激酶的 sephadex G-25 以释放重组人干扰素 β 。释放或未释放的蛋白均可用于保护人体细胞的病毒感染。该方法可用于生产不同生物学活性的蛋白质。因此,这些蛋白质可用于制备新的免疫调节和抗病毒药物等。^③

1.2.2.2 红细胞生成素 (EPO) 类药物

红细胞生成素,又称促红细胞生成素或红细胞生长刺激因子,其生理作用是促进

① 朱筠,等. 重组大肠杆菌 BL21 (pBAI) 生产人干扰素 α 2b [J]. 华东理工大学学报, 2008, 34 (2): 184-188.

② 罗琪,等. 重组人干扰素 α 2b 和胸腺肽 α 1 融合蛋白的分离纯化 [J]. 北京化工大学学报, 2008, 35 (5): 82-84.

③ SEMIKHIN A. S., et al. Human recombinant interferon-beta constructed based on affinity-binding domain technology [J]. Molecular Genetics Microbiology and Virology, 2009, 24 (4): 207-211.