



生物制药工程系列丛书（一）

基因工程药物的 制备原理与应用

主编 李校堃 袁 辉



暨南大学出版社
Jinan University Press

生物制药工程系列丛书（一）

基因工程药物的 制备原理与应用

主编 李校堃 袁 辉



暨南大学出版社
Jinan University Press

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程药物的制备原理与应用/李校堃, 袁辉主编. —广州: 暨南大学出版社, 2003. 8

(生物制药工程系列丛书)

ISBN 7-81079-237-7

I. 基… II. ①李… ②袁… III. 遗传工程—药物—制造 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 020547 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 编辑部 (8620) 85226593 85221601 85226583

营销部 (8620) 85226712 85228291 85220602 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 暨南大学出版社照排中心

印 刷: 暨南大学印刷厂

开 本: 850mm × 1168mm 1/16

印 张: 16

字 数: 420 千

版 次: 2003 年 8 月第 1 版

印 次: 2003 年 8 月第 1 次

印 数: 1—3000 册

定 价: 25.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社营销部联系调换)

总序

基因工程技术的诞生使一些新型药物如核酸、蛋白质类药物的产量大大增加，成本也大幅度降低。基因工程药物在改善人类健康、提高人类生活质量方面正发挥着日益重要的作用。我国紧随世界的发展步伐，生产出了诸如白介素、碱/酸性成纤维细胞生长因子等代表性药物。但是基因工程制药的教育和出版落后于生产和市场的快速发展，目前国内此类图书还为数不多。

为此，暨南大学药学院李校堃教授等人开始主编“生物制药工程系列”丛书，而《基因工程药物的制备原理与应用》是此丛书的第一部书籍。李校堃在老一辈生物工程师林剑教授等的指导下，曾参与和主持国家生物技术领域八五、九五、十五及 863 项目，围绕此项目又参与自然科学基金重点项目、973 项目等，并完成了两个基因工程一类新药产业化，获得国家级、省部级多个奖项，可以说该团队在基因工程药物研究方向积累了丰富的经验。李校堃教授负责的暨南大学医药生物技术研究开发中心，在生长因子药物用于创伤修复领域的基础应用、临床应用以及产业化方面作出了大量贡献。

本丛书还将推出《海洋生物制药》、《现代中药制药》、《动物制药》、《植物制药》、《抗体工程》等书籍。《基因工程药物的制备原理与应用》一书上篇重在阐述基因工程制药的一些策略性问题，下篇则以国内上市的主要基因工程药物为例介绍了一些具体生产工艺及质检措施。

本书较好地反映了基因工程制药领域里的先进理论和实用技术，适用于该领域的科研和生产，也可作为广大师生手头的一部较好的教科书。希望李校堃教授等继续努力，出版更多更好的此类书籍奉献给读者，为祖国生物制药的发展贡献出应有的力量。

中国工程院院士



2003 年 8 月

序

自从 1953 年发现 DNA 的双螺旋结构, 20 世纪 70 年代 DNA 重组技术诞生以来, 以重组 DNA 技术为核心的现代生物技术产业开始蓬勃发展。目前, 我国生物医药公司整体运行发展势头良好, 规模和实力不断增强, 随之而来的是对相关人才和相关知识的迫切需求。

值此之际, 李校堃教授等主编了《基因工程药物的制备原理与应用》一书。李校堃在老一辈生物学家林剑教授等的指导下, 曾参与和主持国家生物技术领域八五、九五、十五及 863 项目。围绕此项目又参与自然科学基金重点项目、973 项目等, 并完成了两个基因工程一类新药产业化, 获得国家级、部级多个奖项。李校堃教授负责的暨南大学医药生物技术研究开发中心在基因工程药物研究方面积累了丰富经验, 并编写了《基因工程药物的制备原理与应用》。

《基因工程药物的制备原理与应用》一书分 2 篇 14 章, 分别由从事基因工程制药的中青年科技专家执笔, 上篇从策略上讲述了基因工程药物的上游构建、中游发酵和下游纯化的原理与技术, 下篇则以国内上市的主要基因工程药物为例, 介绍了生产工艺及质控技术与要求。

本书讲述了基因工程制药领域里的先进、实用的观点和技术, 是一部基础理论与实用技术相结合, 理工并备的技术专著, 反映了我国基因工程药物的发展及成就, 是对发展基因工程药物事业的又一大贡献。本书对基因工程制药领域的广大科研技术人员来说, 这是一本值得推荐的案头书, 也可作为药理学教学方面的参考教材。希望本书的出版能促进我国基因工程制药事业的发展。

中国工程院院士 李校堃

2003 年 8 月

目 录

绪论 基因工程药物的发展与对策	(1)
概述	(1)
一、国外基因工程药物的现状	(2)
二、国际医药界竞争与趋势	(5)
1. 全球化兼并浪潮	(6)
2. 美、欧、日三分天下	(7)
3. 今后趋势	(9)
三、国内基因工程药物的历史与现状	(10)
1. 国内基因工程药物发展的历史	(10)
2. 国内基因工程药物发展的现状	(12)
3. 我国市场上的生物药品	(12)
四、我国的基因工程新药研发形势严峻	(16)
1. 企业规模过小	(16)
2. 企业一哄而上	(16)
3. 缺乏产业化的接轨机制	(16)
4. 专利保护问题	(17)
5. 基因工程药品种类少、创新能力薄弱	(17)
6. 基因制药支撑产业极其薄弱	(17)
7. 产业化后处理技术落后	(17)
五、我国基因制药业发展的机遇与对策	(18)
1. 我国生物医药产业面临的发展机遇	(18)
2. 我国基因制药业发展的对策	(19)
参考文献	(21)
第一章 基因工程上游构建与原理	(23)
概述	(23)
第一节 质粒不稳定性及其措施	(23)
一、重组分子的结构或分配不稳定性	(23)
二、质粒拷贝数	(24)
三、质粒的多聚体形式	(25)
四、大肠杆菌细胞内有关分裂基因	(25)
五、质粒的存在对生长的影响	(26)
六、质粒不稳定性的措施	(27)

第二节 常见的操纵子	(28)
一、乳糖操纵子	(28)
二、 <i>trp</i> 操纵子	(31)
三、 P_L 启动子	(33)
第三节 常用的大肠杆菌表达载体	(33)
一、pET 载体	(33)
二、携带 <i>trp</i> 启动子的表达载体	(35)
三、携带 λP_L 启动子的表达载体	(36)
第四节 启动子	(36)
一、保守序列的影响	(36)
二、 <i>Lac</i> 启动子及其衍生物	(37)
三、T7 启动子及 pET 载体	(37)
四、 <i>CspA</i> 冷休克启动子	(38)
五、营养可诱导型启动子	(38)
六、转录终止子	(38)
第五节 翻译	(39)
一、RBS 及起始密码子上下游序列	(39)
二、下游盒子	(40)
三、翻译终止子	(40)
四、密码子的影响	(40)
五、mRNA 稳定性	(41)
第六节 蛋白质的折叠	(42)
一、细胞质内折叠	(42)
1. 大肠杆菌细胞内环境	(42)
2. 分子伴侣	(42)
二、周质的折叠	(45)
1. 周质的环境	(45)
2. Dsb 家族蛋白	(45)
3. 周质折叠在重组蛋白表达中的应用	(48)
第七节 外源基因表达效率的提高	(49)
一、表达部位	(50)
1. 周质中表达	(50)
2. 胞外表达	(52)
二、融合蛋白表达	(52)
1. 融合蛋白表达的优点	(52)
2. 融合技术的缺陷	(53)
3. 用于融合蛋白切割的酶	(53)
三、异源蛋白质的降解问题	(53)

1. 细胞质降解	(54)
2. 周质降解	(54)
四、异源基因表达后活性的检测	(55)
参考文献	(56)
第二章 基因工程菌种库的建立	(65)
第一节 原始菌种库的建立	(65)
一、菌种概述	(65)
二、菌种质量标准	(66)
三、原始菌种库的建立	(67)
第二节 主代种子批的建立	(68)
一、菌种活化	(68)
二、筛选单菌落菌株	(68)
三、高表达量菌株的扩增	(68)
四、主代菌株的冻干	(68)
五、主代菌种的检定	(68)
第三节 工作种子批的建立	(69)
一、菌种的活化	(69)
二、菌种的扩增	(69)
三、工作种子批的建立	(69)
第四节 菌种稳定性	(69)
一、工程菌菌种的稳定性检测	(69)
二、质粒的遗传稳定性检测	(70)
参考文献	(72)
第三章 大肠杆菌工程菌发酵生产的工艺控制	(73)
大肠杆菌工程菌发酵工艺控制概述	(73)
一、概述	(73)
二、基因工程菌发酵的分类	(74)
1. 间歇式发酵	(74)
2. 分批流加式发酵	(75)
3. 连续式发酵	(75)
4. 透析式发酵	(76)
5. 固定化发酵	(76)
三、工程菌的代谢过程优化控制	(76)
1. 途径工程和发酵工程的联合控制	(76)
2. 发酵工程和生物反应器的联合控制	(76)
四、生物反应器类型	(77)

第一节 大肠杆菌生长原理	(78)
一、大肠杆菌特性	(78)
二、大肠杆菌生长原理	(79)
三、影响大肠杆菌生长的因素	(79)
1. 营养	(79)
2. 温度	(80)
3. pH	(81)
4. 溶氧	(81)
5. 渗透压	(81)
6. 水活度	(82)
7. 代谢副产物	(82)
第二节 大肠杆菌工程菌高密度发酵工艺控制原理与方法	(83)
概述	(83)
一、基因工程菌的遗传不稳定性及其对策	(83)
1. 工程菌遗传不稳定的表现与机制	(84)
2. 质粒的存在对大肠杆菌宿主菌的生理影响	(84)
3. 质粒不稳定性防制措施	(85)
二、包涵体形成的发酵控制	(86)
1. 概述	(86)
2. 包涵体的形成机理	(86)
3. 影响高效表达的重组异源蛋白在大肠杆菌中形成包涵体的因素	(86)
4. 改善包涵体形成的措施	(87)
三、醋酸形成的机理与防制措施	(87)
1. 醋酸的毒害作用	(87)
2. 醋酸积累的机理	(88)
3. 溢流代谢与混合酸发酵	(89)
4. 菌株特性	(90)
5. 防止醋酸形成的措施	(90)
四、培养基的优化	(91)
1. 原理	(91)
2. 工程菌培养基设计的基本原则	(91)
3. 大肠杆菌工程菌培养基设计	(91)
五、流加策略	(95)
1. 流加的目的和意义	(95)
2. 流加的方法	(95)
六、重组蛋白表达中的高密度发酵溶氧控制	(99)
1. 溶氧(DO)的影响	(99)
2. 溶氧参数 K_{La} 和 OLR 的测定	(99)

3. $K_{L,a}$ 和 OUR 的变化与控制	(100)
4. 溶氧与发酵规模的放大	(102)
参考文献	(105)
第四章 嗜甲醇酵母工程菌的发酵生产	(112)
概述	(112)
一、嗜甲醇酵母	(112)
二、毕赤氏巴斯德酵母	(112)
第一节 毕赤氏巴斯德酵母发酵的重组蛋白生产	(113)
第二节 汉逊氏多形酵母与巴斯德毕赤氏酵母的重要区别	(118)
参考文献	(120)
第五章 基因工程药物的分离纯化技术	(122)
概述	(122)
一、蛋白纯化的分离依据	(122)
二、分离纯化的基本过程	(123)
第一节 沉淀	(124)
一、盐析法	(125)
1. 原理	(125)
2. 影响因素	(125)
3. 硫酸铵盐析应该注意的问题	(126)
二、有机溶剂沉淀法	(126)
三、等电点沉淀	(126)
四、非离子多聚物沉淀法	(127)
第二节 生物技术中的膜分离	(127)
概述	(127)
一、微过滤	(127)
二、标准流动净化	(128)
三、超滤	(128)
四、病毒过滤	(129)
五、高效切线流动过滤	(129)
六、膜层析	(130)
第三节 凝胶过滤层析	(130)
一、凝胶过滤层析的原理	(130)
二、凝胶过滤层析介质	(133)
三、凝胶过滤层析的操作	(133)
1. 装填	(133)

2. 检验	(134)
3. 加样	(134)
第四节 离子交换层析	(134)
一、离子交换柱层析原理	(134)
二、离子交换剂种类	(135)
三、交换容量的测定	(136)
1. DEAE 树脂交换容量的测定	(136)
2. CM 树脂交换容量的测定	(136)
四、离子交换层析的应用策略	(136)
1. 容量	(136)
2. 起始条件	(136)
3. pH	(137)
4. 离子强度	(137)
5. 洗脱	(137)
6. 应用实例	(138)
五、应用实例	(138)
1. 填柱	(138)
2. 平衡	(139)
3. 层析操作	(139)
第五节 亲和层析	(139)
一、亲和层析的原理	(140)
二、亲和层析载体	(140)
三、载体的处理	(141)
1. 载体的活化	(141)
2. 配体偶联	(141)
3. 间隔手臂	(141)
4. 封闭	(141)
四、亲和层析操作	(142)
1. 预处理	(142)
2. 上样	(142)
3. 洗涤	(142)
4. 洗脱	(142)
第六节 蛋白质的保存和真空冷冻干燥	(143)
一、蛋白质的保存方法	(143)
1. 液态保存	(143)
2. 固态保存	(144)
二、真空冷冻干燥的原理	(144)
1. 冻干机的组成和冻干程序	(144)
2. 冷冻干燥的程序	(145)

3. 共溶点及其测量方法	(146)
4. 产品的预冻	(146)
5. 产品的第一阶段干燥	(148)
6. 产品的第二阶段干燥	(148)
7. 影响干燥过程的因素	(149)
8. 冻干曲线和时序的制定	(150)
9. 冻干的后处理	(152)
参考文献	(153)
第六章 基因工程药物的质量控制	(154)
第一节 基因工程药物的原材料的质量控制	(154)
一、对制药用水的质量控制	(154)
二、活体原料的质量控制	(158)
三、投产用的化学试剂的质量控制	(158)
第二节 基因工程药物的中间体的质量控制	(158)
一、发酵或细胞大量培养过程的质量控制	(158)
1. 遗传稳定性	(159)
2. 产品的产率及产品的稳定性	(159)
3. 防止污染	(159)
4. 培养基质量	(160)
二、分离纯化过程的质量控制	(160)
第三节 基因工程药物的原液的质量控制	(161)
一、原核表达系统生产的基因工程药物原液质控标准	(161)
二、真核表达系统生产的基因工程药物原液质控标准	(161)
第四节 基因工程药物的半成品质量控制	(162)
第五节 基因工程药物的成品质量控制	(163)
参考文献	(163)
第七章 基因工程药物的稳定性	(164)
第一节 稳定性试验	(164)
一、稳定性报告的内容	(164)
1. 产品的一般资料	(164)
2. 规格标准和检验方法资料研究	(164)
3. 研究设计和研究条件	(164)
4. 稳定性数据 (资料)	(165)
5. 数据分析和结论	(165)
二、稳定性试验设计	(165)
1. 总则	(165)

2. 目的	(165)
3. 批次选择	(165)
4. 包装与容器	(165)
5. 反映稳定性的指标	(166)
6. 试验设置条件	(166)
7. 检测频率	(167)
8. 冻干制品溶解后的稳定性	(167)
9. 加速条件和强力破坏条件	(167)
第二节 原液（原料药）的稳定性	(168)
一、批次选择	(168)
二、样品选择	(168)
三、试验设置及检测频率	(169)
四、原液稳定性验证指标	(169)
1. 无保护剂原液样品	(169)
2. 有保护剂原液样品	(169)
3. 强力破坏条件	(169)
第三节 半成品的稳定性验证	(169)
一、批次选择	(170)
二、样品的选择	(170)
三、试验设置及检测频率	(170)
四、半成品稳定性验证指标	(170)
第四节 成品（制剂）的稳定性	(170)
一、批次选择	(170)
二、样品的选择	(171)
三、试验设置及检测频率	(171)
四、成品（制剂）的稳定性验证指标	(171)
应用实例	
第八章 重组人白介素-2	(172)
第一节 简介	(172)
一、命名	(172)
二、生物学活性	(172)
三、临床应用	(172)
第二节 结构与性质	(173)
第三节 重组人白细胞介素-2的工程菌构建	(174)
第四节 重组人白介素-2的制备	(175)
一、工艺流程	(175)
二、发酵	(176)

1. 种子液制备	(176)
2. 发酵培养	(176)
三、粗纯	(176)
1. 原则	(176)
2. 制备程序	(177)
四、精纯	(178)
1. 工艺流程	(178)
2. S-200 柱/S-100 柱装填	(178)
3. 平衡	(179)
4. 上样	(179)
5. 洗脱	(179)
6. 收样	(179)
7. 柱再生	(179)
五、复性	(179)
1. 工艺流程	(179)
2. 还原型 rIL-2 的氧化复性	(179)
3. 影响 IL-2 的氧化复性的因素	(179)
六、反向高效液相纯化 rIL-2	(180)
1. RP-HPLC 纯化	(180)
2. 旋转蒸发去除乙腈	(181)
七、纯化结果与分析	(181)
第五节 重组人白介素-2 的质量控制	(181)
参考文献	(183)
第九章 重组人干扰素 $\alpha 2b$	(184)
第一节 干扰素简介	(184)
一、命名及分类	(184)
二、生物学活性临床应用	(184)
1. 抗病毒作用	(184)
2. 抗肿瘤作用	(184)
3. 免疫调节作用	(184)
4. 消除或修复 DNA 结构损伤的作用	(185)
第二节 重组人干扰素的结构与性质	(185)
第三节 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的制备	(185)
一、生产工艺流程	(185)
二、干扰素 $\alpha 2b$ 的发酵	(186)
1. 种子液的制备	(186)
2. 发酵培养	(187)

三、粗纯	(187)
1. 原则	(187)
2. 细菌的破碎	(187)
3. 包涵体的裂解	(187)
4. 分段稀释法复性	(188)
5. 酸化	(188)
四、精纯	(188)
1. DEAE Sepharose F.F 层析	(188)
2. Sepharyl S-100 分子筛层析	(188)
3. CM Sepharose F.F 柱层析	(189)
五、纯化结果分析	(190)
第四节 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的质量控制标准	(190)
参考文献	(191)
第十章 生长素	(192)
第一节 简介	(192)
一、命名	(192)
二、生物学活性	(192)
三、临床应用	(192)
第二节 结构与活性	(193)
第三节 制备	(193)
一、hGH 原料药生产工艺流程图	(193)
二、发酵培养参数	(194)
三、粗提	(194)
四、层析纯化	(194)
第四节 质量监控标准	(195)
第十一章 粒/巨噬细胞集落刺激因子	(196)
第一节 简介	(196)
一、命名	(196)
二、生物学活性	(196)
三、临床应用	(196)
第二节 结构与功能	(197)
第三节 制备	(197)
一、GM-CSF 工艺流程及质量控制点	(197)
二、发酵培养参数	(197)
三、粗提	(197)
四、层析纯化	(198)

第十二章 集落刺激因子	(200)
第一节 简介	(200)
一、命名	(200)
二、生物学活性	(200)
三、临床应用	(200)
第二节 结构及活性	(201)
第三节 制备	(201)
一、rhG-CSF 原料药生产工艺流程图	(201)
二、醇培养参数	(201)
三、粗提	(201)
四、层析纯化	(201)
第四节 质量监控标准	(203)
第十三章 促红细胞生成素	(204)
一、前言	(204)
二、分子结构及特性	(204)
三、rhEPO 的发酵表达	(205)
1. 工作细胞复苏	(205)
2. 细胞扩增	(206)
3. 表达培养	(206)
四、rhEPO 的纯化	(206)
五、检定	(207)
1. 活性	(207)
2. 唾液酸含量	(207)
3. 纯度	(207)
4. 相对分子质量	(207)
5. 等电点	(207)
6. CHO 细胞残存蛋白	(207)
7. 牛血清残存量	(207)
六、rhEPO 的临床应用	(208)
1. 慢性肾功能衰竭 (CRF)	(208)
2. HIV 感染/ZDU 治疗病人	(208)
3. 类风湿性关节炎	(208)
4. 癌性贫血	(208)
5. 早产儿贫血	(208)
七、EPO 的发展	(208)

第十四章 重组乙型肝炎疫苗	(210)
第一节 总论	(210)
一、乙型肝炎病原学	(210)
二、乙型肝炎的流行病学	(211)
1. 传染源	(211)
2. 传播途径	(211)
三、乙型肝炎的免疫预防	(211)
1. 接种对象	(211)
2. 用法	(211)
3. 注意事项	(212)
4. 规格	(212)
5. 有效期	(212)
四、乙型肝炎病毒的分生物学研究	(212)
1. 乙肝病毒表面抗原基因与蛋白成分	(212)
2. 乙肝病毒表面抗原的三种蛋白	(212)
3. 前 S ₁ 的优势表位	(212)
4. 前 S ₂ 的优势表位	(212)
五、各种乙型肝炎蛋白疫苗的评价	(213)
1. 小蛋白疫苗	(213)
2. 中蛋白疫苗	(213)
3. 大蛋白疫苗	(213)
六、新型疫苗的研制	(214)
1. 抗原表位的意义和特点	(214)
2. 重组乙型肝炎疫苗的自身特点	(214)
3. 乙肝病毒免疫优势表位疫苗的设计和制备	(215)
七、基因工程乙型肝炎疫苗的表达式	(217)
1. 大肠杆菌表达式	(217)
2. 酵母表达式	(217)
3. 昆虫细胞表达式	(217)
4. CHO 表达式	(218)
5. 展望	(219)
第二节 重组 (CHO 细胞) 乙型肝炎疫苗生产工艺	(219)
一、工艺流程	(219)
二、重组 CHO 细胞的培养	(220)
1. 细胞库的建立	(220)
2. 生产用细胞的全面检定	(220)
3. 生产用主要材料的检定	(221)
4. 培养条件	(221)
三、重组 CHO 乙型肝炎疫苗的纯化	(222)