

声 明

本电子书由中国轻工业出版社出版,相关权利归中国轻工业出版社所有。读者、著作权人和(或)依法可以行使著作权的权利人如有疑问,请与中国轻工业出版社联系:

地址:北京市东长安街6号

邮编:100740

电话:85119838

Email: xnxtm@yahoo.com.cn

中国轻工业出版社

高等学校专业教材

生物制药技术

郭 勇 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物制药技术/郭勇主编. -北京:中国轻工业出版社, 2005.2

高等学校专业教材

ISBN 7-5019-2430-9

I. 生… II. 郭… III. 生物制品: 药物-制造-高等学校-教材 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 30402 号

责任编辑: 唐是雯 白 洁 责任终审: 滕炎福 封面设计: 东远先行图文设计公司
版式设计: 丁 夕 责任校对: 方 敏 责任监印: 吴京一

*

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 北京工大印刷厂

经 销: 各地新华书店

版 次: 2005 年 2 月第 1 版第 5 次印刷

开 本: 850 × 1168 1/32 印张: 20.5

字 数: 533 千字

书 号: ISBN 7-5019-2430-9/Q·005 定价: 38.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-65141375 65128898

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

·如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换·

50106J4C105ZBW

前 言

回顾20世纪,生物科学与生物技术的发展非常迅速,已从整体水平进入细胞和分子水平,在基础和应用研究中取得举世瞩目的成果。其中生物制药技术更是生物技术领域的一颗耀眼明星。自1944年青霉素液体深层发酵成功以来,随着生物科学和生物技术的发展,相继出现微生物发酵制药、酶工程制药、基因工程制药、细胞工程制药、动植物细胞发酵制药等前所未闻的新技术。初步形成了生物制药技术的学科体系。

展望21世纪,生物科学与生物技术的发展将进一步揭示生命的奥秘,在世界科技和经济发展中起主导和支柱作用。而作为生物技术核心内容之一的生物制药技术在保证和促进人类健康长寿方面将发挥巨大作用。

为了适应学科发展的需要,根据全国普通高等院校轻工食品类专业教学指导委员会生物工程专业教学指导小组会议决定,新编《生物制药技术》教材,供生物工程、制药工程、发酵工程和相关专业的研究生和本科高年级学生使用。

《生物制药技术》由郭勇负责主编,姚汝华教授担任主审。全书共分七章。其中,第一章由陶文沂,第二章由杨汝德,第三章由王昌禄、王敏和路福平,第四章由郭勇,第五章由贾士儒、路福平,第六章由张毅,第七章由许赣荣负责编写。

在编写过程中,得到国家轻工业局、国家医药总局、华南理工大学、无锡轻工大学、天津轻工业学院及各有关单位领导的关怀和支持,保证了编写工作的顺利进行,并承蒙有关专家、教授的热情支持和帮助,提供了不少资料和宝贵意见,在此谨表衷心谢意。

本书中凡成分的含量(浓度)以%表示的,一般均指质量分数。

由于生物制药技术是一门正在飞速发展的新兴学科,没有现成的教材可供参考,资料多而分散,给编写带来不少困难。加上编者水平所限,不当之处,诚请批评指正。

主编 郭勇

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 生物制药的概念和内容	(1)
第二节 生物药物的性质与分类	(2)
一、生物药物的性质及质量保证	(2)
二、生物药物的分类	(6)
第三节 新型生物药物研制的理论和方法	(11)
一、新药研究和开发的主要过程	(12)
二、先导化合物的寻找	(14)
第四节 生物制药的发展历史和概况	(20)
一、生物制药的发展历史	(20)
二、生物制药的发展概况	(23)
三、微生物工程	(26)
四、酶工程	(27)
第五节 生物制药的发展趋势	(28)
一、生物制药中的新技术	(29)
二、人类基因组计划(Human genome project, 简称HGP)	(31)
三、基因治疗	(32)
四、糖链工程	(34)
五、细胞因子类药物	(35)
第二章 基因工程制药	(37)
第一节 基因工程制药概述	(37)
第二节 基因工程制药中常用的工具酶和克隆载体	(46)
一、基因工程制药中常用工具酶	(46)

二、基因工程制药中常用的克隆载体·····	(56)
第三节 基因工程药物无性繁殖系的组建 ·····	(72)
一、基因工程药物目的基因的制取·····	(72)
二、目的基因与克隆载体的体外重组·····	(85)
三、重组克隆载体引入宿主细胞的转化与感染·····	(92)
四、含目的基因重组体的筛选、鉴定与分析·····	(100)
五、目的基因在宿主细胞中的表达·····	(109)
六、基因工程药物无性繁殖系的组建实例·····	(115)
第四节 基因工程药物的生产 ·····	(128)
一、基因工程菌株(细胞)的培养与发酵·····	(128)
二、基因工程药物的分离纯化·····	(133)
三、基因工程药物的质量控制·····	(138)
第三章 细胞工程制药 ·····	(139)
第一节 概述 ·····	(139)
第二节 细胞融合 ·····	(143)
一、细胞融合技术的发展·····	(143)
二、细胞工程中遗传物质的转移途径·····	(146)
三、细胞融合的方法·····	(149)
四、影响细胞融合的因素·····	(151)
五、细胞融合操作中的技术问题·····	(152)
六、杂种细胞的筛选原理及筛选系统·····	(156)
七、杂种细胞有用性状的检测系统·····	(158)
八、控制杂种细胞遗传表现型的机制·····	(159)
九、微生物原生质体融合技术·····	(162)
十、植物原生质体制备、培养与融合技术·····	(173)
十一、动物细胞融合技术·····	(187)
第三节 杂交瘤技术与单克隆抗体 ·····	(188)
一、单克隆抗体·····	(189)
二、杂交瘤技术·····	(191)

三、杂交瘤细胞培养及单克隆抗体的生产	(210)
四、单克隆抗体研究方向和新型单克隆抗体	(214)
五、单克隆抗体的应用	(218)
六、单克隆抗体应用风险及局限性	(223)
第四节 生物转化生产甾体药物	(225)
一、生物转化及其特点	(225)
二、甾体药物	(227)
三、甾体药物生物转化反应的类型	(230)
四、甾体药物的生物转化工艺	(238)
第四章 酶工程制药	(246)
第一节 概述	(246)
一、酶的催化特性	(247)
二、影响酶催化作用的主要因素	(248)
三、酶的分类与命名	(257)
四、酶活力的测定	(259)
第二节 药用酶的生产	(261)
一、酶生物合成及其调节理论	(262)
二、药用酶生产细胞的选择	(269)
三、提高药用酶产量的措施	(273)
四、药用酶的分子修饰	(276)
五、酶在疾病预防和治疗方面的应用	(289)
第三节 药物的酶法生产	(293)
一、酶的选择与反应条件的优化	(293)
二、酶和菌体固定化	(294)
三、酶的非水相催化	(307)
四、酶在药物制造方面的应用	(310)
第五章 微生物发酵制药	(318)
第一节 概述	(318)
一、微生物发酵制药的发展简史	(318)

二、微生物发酵制药的研究范围·····	(320)
三、微生物发酵药物的分类·····	(322)
四、微生物发酵制药研究的发展趋势·····	(324)
第二节 制药微生物与产物的生物合成·····	(325)
一、制药微生物的选择·····	(325)
二、制药微生物菌种的选育·····	(326)
三、微生物代谢产物的生物合成·····	(330)
四、微生物生物合成的主要调节机制·····	(344)
第三节 发酵工艺条件的确定·····	(354)
一、培养基及其制备·····	(355)
二、灭菌操作技术·····	(362)
三、发酵工艺条件的确定及主要控制参数·····	(366)
第四节 发酵过程及其优化控制·····	(388)
一、抗生素发酵生产·····	(388)
二、维生素及辅酶类药物的生产·····	(409)
三、蛋白质、多肽、氨基酸和核酸类药物·····	(415)
四、微生物生产的其他类药物·····	(426)
第六章 动植物细胞培养技术制药 ·····	(438)
第一节 动物细胞培养技术及其应用·····	(438)
一、概述·····	(438)
二、动物细胞培养的特性·····	(440)
三、培养基的组成与制备·····	(441)
四、细胞培养过程的检测·····	(452)
五、动物细胞培养方法与操作方式·····	(461)
六、动物细胞大规模培养系统·····	(468)
七、动物细胞大规模培养技术的应用·····	(478)
八、工艺实例·····	(480)
第二节 植物细胞培养技术及其应用·····	(487)
一、植物细胞培养的研究进展·····	(487)

二、植物细胞培养的特性与营养	(494)
三、植物细胞培养的类型与技术	(504)
四、植物细胞培养的应用	(522)
第七章 生物药物的提取纯化技术	(535)
第一节 概述	(535)
一、生物药物的特点	(535)
二、提取纯化的单元操作和基本工艺流程	(535)
三、提取纯化单元操作技术的特点	(536)
四、提取纯化的工艺论证	(538)
五、生物药物生产的屏蔽防护技术(Containment technology)	(539)
六、纯化工艺过程的质量控制	(540)
第二节 预处理及固液分离技术	(542)
一、概述	(542)
二、直接从发酵液中提取产品(以抗生素为例)	(542)
三、细胞破碎(Cell disruption)	(544)
四、离心(Centrifugation)	(546)
五、膜分离技术	(547)
六、渗滤(Diafiltration)技术和透析(Dialysis)	(555)
七、反渗透(Reverse osmosis)	(556)
八、膜分离技术的应用	(557)
九、泡沫分离	(561)
第三节 沉淀	(563)
一、沉淀	(563)
二、盐析	(565)
三、有机溶剂沉淀	(567)
四、其他沉淀技术	(567)
五、亲和沉淀(Affinity precipitation)	(568)
六、沉淀的应用	(570)

第四节 萃取(Extraction)·····	(572)
一、概述·····	(572)
二、抗生素萃取操作的影响因素·····	(573)
三、溶剂的选择(以抗生素为例)·····	(574)
四、萃取方式·····	(575)
五、萃取技术的应用·····	(576)
六、脂类药物的提取和纯化·····	(579)
七、双水相萃取·····	(581)
八、反胶束提取纯化技术(Reversed Micelles Purification)·····	(585)
九、超临界萃取技术·····	(591)
第五节 吸附(Sorption)·····	(592)
一、层析的基本知识·····	(593)
二、离子交换技术·····	(598)
三、大网格聚合物吸附·····	(606)
四、凝胶过滤(Gel filtration)·····	(608)
第六节 亲和层析(Chromatography)·····	(611)
一、亲和层析概述·····	(611)
二、共价亲和层析(Covalent Affinity Chromatography)·····	(613)
三、疏水层析(Hydrophobic Chromatography)·····	(614)
四、固定化金属离子亲和层析(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography,IMAC)·····	(616)
五、免疫亲和层析·····	(618)
六、染料配基层析·····	(620)
七、凝集素(Lectin)亲和层析·····	(621)
八、核酸类亲和层析去除热原·····	(622)
九、置换层析·····	(623)
十、色谱聚焦(Chromatofocusing)·····	(625)

十一、高压亲和层析·····	(627)
十二、合理设计层析方案(以蛋白质、酶 及肽类药物为例)·····	(627)
第七节 新型层析分离纯化装置及介质·····	(633)
一、分离纯化装置·····	(634)
二、预装柱介质·····	(640)
主要参考文献·····	(641)

第一章 绪 论

第一节 生物制药的概念和内容

生物制药是指利用生物体或生物过程生产药物的技术。生物制药技术是一门讲述生物药物,尤其是生物工程相关药物的研制原理、生产工艺及分离纯化技术的应用学科。生物制药技术是一门既古老又年轻的学科,人们利用生物药物治疗有着悠久的历史。古代的中国在此方面曾创造了光辉的成就。现代生物制药是医学、生物化学、分子生物学、细胞生物学、有机化学和重组DNA技术、单克隆抗体技术等综合而形成的。近代随着对疾病机理的理解,发明了抗生素。抗生素的工业化生产是现代生物制药工业化的开端。特别是进入20世纪50年代,DNA双螺旋结构的发现及随之而来的分子生物学的诞生、重组DNA技术的应用,不仅改造了生物制药旧领域,而且还开创了许多新领域,给生物制药带来了变革性的影响。生物制药的研究内容按生物工程学科范围分为以下4类:

(1) 发酵工程制药 发酵工程制药是指利用微生物代谢过程生产药物的技术。此类药物有抗生素、维生素、氨基酸、核酸有关物质、有机酸、辅酶、酶抑制剂、激素、免疫调节物质以及其他生理活性物质。主要研究微生物菌种筛选和改良、发酵工艺的研究、产品后处理即分离纯化等问题。当今重组DNA技术在微生物菌种改良中起着越来越重要的作用。

(2) 基因工程制药 基因工程制药是指利用重组DNA技术生产蛋白质或多肽类药物。这些药物常是一些人体内的活性因

子,如干扰素、胰岛素、白细胞介素-2、EPO等。主要研究相应基因的鉴定、克隆、基因载体的构建与导入、目的产物的表达及分离纯化等问题。现在正兴起的基因治疗是这一技术的一个新领域。

(3) 细胞工程制药 细胞工程制药是利用动、植物细胞培养生产药物的技术。利用动物细胞培养可生产人类生理活性因子、疫苗、单克隆抗体等产品;利用植物细胞培养可大量生产经济价值较大的植物有效成分,也可生产人活性因子、疫苗等重组DNA产品。现今重组DNA技术已用来构建能高效生产药物的动、植物细胞株系或构建能产生原植物中没有的新结构化合物的植物细胞系。它主要研究动、植物细胞高产株系的筛选、培养条件的优化以及产物的分离纯化等问题。

(4) 酶工程制药 酶工程制药是将酶或活细胞固定化后用于药品生产的技术。它除了能全程合成药物分子外,还能用于药物的转化,如我国成功地利用微生物两步转化法生产维生素C。它主要研究酶的来源、酶(或细胞)固定化、酶反应器及相应操作条件等。酶工程生产药物具有生产工艺结构紧凑、目的产物产量高、产物回收容易、可重复生产等优点。酶工程作为发酵工程的替代者,其应用具有广阔的前景。

第二节 生物药物的性质与分类

一、生物药物的性质及质量保证

(一) 生物药物的性质

在人类文明进步的漫长历程中,生物药物的发现和使用也伴随着这一历程而发展。生物药物的使用越来越多,范围越来越宽。经人们长期使用后发现,生物药物使用安全,毒性小。随着现代医疗理论的进步,开发出的人体内生理活性因子,由于源自人体自身,故使用时毒性低、副作用小,疗效可靠。在药理学上,这类人体

活性因子具有特异治疗活性。现在正开发的治疗用基因、核糖核酸酶(RNase)、单克隆抗体及与之伴随产生的“生物导弹”也正利用这一特异性的优势。

生物药物的有效成分在生物材料中浓度很低,杂质的含量相对较高,如胰腺中脱氧核糖核酸酶的含量为0.004%,胰岛素的含量为0.002%。生长激素抑制素(Somatostatin)在十万只羊的下丘脑中才含有1mg。生物药物的相对分子质量较大,如酶类药物的相对分子质量介于一万到五十万之间,抗体蛋白的相对分子质量为五万到九十五万。多糖类药物的相对分子质量小的上千,大的可上百万。这类生物药物功能的发挥需要保持其特定的生理活性结构,故它们对酸碱、重金属、热等理化因素的变化较敏感。生物制药所用的材料大多含有丰富的营养成分,利于微生物生长,故易被微生物分解。另外,生产中搅拌力、金属器械及空气等也可能对活性有影响。因此,生产中必须全面严格控制,包括从原料选择和预处理、生产工艺、制剂成型、保藏、运输及使用各个环节。

特别要提到的是利用重组DNA技术生产的药品,即新生物技术药品,或简称为生物新药。生物新药是指将生物体内的生理活性物质的遗传基因分离出来,并通过大肠杆菌、酵母菌等宿主进行大量生产的药品(包括疫苗),如胰岛素、干扰素、白细胞介素-2等。生物新药具有以下一些特点:

(1) 成分复杂,大多是复杂的蛋白质混合物,不能简单地用其最终产品来鉴定,不像化学药品一样可对其成分进行精确的定性、定量分析。

(2) 不稳定,易变性,易失活。

(3) 易为微生物污染、破坏。

(4) 生产条件的变化对产品质量影响较大。导入的基因在宿主细胞中的转录、翻译及翻译产物在细胞内运送、贮存或分泌的各个环节在工艺放大时都有可能受到诸多因素的影响,产生或多或少杂质。

(5) 用量少,价值高。

(二) 生物新药的质量保证

许多基因工程药物,特别是细胞因子药物都可参与人体机能的精细调节,在极微量的情况下就会产生显著的效应,任何性质或数量上的偏差,都可能贻误病情甚至造成严重危害。因此,对基因工程药物产品进行严格的质量控制就显得十分必要。基因工程药物质量控制主要包括以下几项要点:产品的鉴别、纯度、活性、安全性、稳定性和抑制性。任何一种单一的分析方法都已无法满足对该类产品的检测要求。它需要综合生物化学、免疫学、微生物学、细胞生物学和分子生物学等多门学科的相关理论和技术,才能切实保证基因工程药品的安全有效。鉴于基因工程产品生产工艺的特殊性,除鉴定最终产品外,还要从基因的来源及确证、菌种的鉴定、原始细胞库等方面提出质量控制的要求,对培养、纯化等每个环节加以严格把关,才能保证最终产品的有效性、安全性和均一性。下面简要介绍生物新药的鉴定方法和安全性评价。

1. 鉴定方法

由于生物新药结构的特点(一般为生物大分子)及生产方式的特殊性,因此在生产工艺、结构研究及检测项目等方面的要求与化学药品有所不同。由于其相对分子质量一般为几千至几十万,所以很难用元素分析、红外、紫外、核磁共振、质谱等方法进行结构确证。另外,大分子的生化药品即使组成成分相同,也会因相对分子质量不同而产生不同的生理活性,如肝素能明显延长血凝时间、有抗血凝作用,而低分子量肝素,成为新近发展起来的一类抗血栓药物。即使相对分子质量相同,由于空间结构的改变也可使之失去生理活性,如酶是具有生物催化作用的活性蛋白,当其空间结构发生改变,即失去活性,但它的氨基酸组成一级结构仍然保持不变。所以对生化药品的结构和组分的鉴定,还要用生化分析方法加以确证。重组蛋白质药物产品常用的鉴定方法如下:

电泳方法: SDS-PAGE;等电聚焦;免疫电泳

免疫学分析方法: 放射性免疫法 (RIA); 放射性免疫扩散法 (RID); 酶联免疫吸附法 (ELISA); 免疫印渍 (Immunoblotting)

受体结合试验 (Receptor binding)

各种高效液相色谱分析法 (HPLC)

肽图分析法

Edman N-末端序列分析法

圆二色谱法 (CD)

核磁共振法 (NMR)

2. 安全性评价

生物药物除了要保证符合无病毒、无菌、无热原、无致敏原等一般安全性要求外, 还需要根据基因工程产品本身的结构特性, 进行某些药代动力学和毒理学研究。有的产品虽然与人源多肽或蛋白质密切相关, 但在氨基酸序列或翻译后修饰上存在差异, 这就还要求对之进行致突变、致癌和致畸等遗传毒理性质的考察。根据生物技术产品的结构特点, 可分为与人类自身生理活性物质完全相同的药物 (I); 与人类自身生理活性物质相似的药品 (II); 与人类自身生理活性物质完全不同的药品 (III)。欧洲经济共同体 (OECD) 对这三类药品安全性评价见表 1-1。

表 1-1 OECD 生物技术药品的安全性评价

分类	分组	证一 致明 性	药 效	药 动 力 学	急 毒	慢 毒	胚 胎 毒	致 畸	致 突 变	致 癌	局 耐 部 受	免 疫 毒
激素	I a	+			+							
	I b		+		+	+	+	+	+	+		
细胞 分裂 素	II		+		+	+	+	+	+	+	+	+
	III		+		+	+	+	+	+	+	+	+
血液 制品	I		+	+	+							
	II		+	+	+	+						
单抗			+		+	+						
疫苗				+			+	+				

注: a为体内存在, b为体内不存在。