



武汉大学
Wuhan University

第四章 生物制药技术与工程-续

主讲教师：台万一

武汉大学药学院



第四节 现代生物技术制药的基本技术与工艺

传统微生物发酵 vs 现代生物技术发酵

指利用微生物代谢过程生产药物的技术。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要，因此21世纪用于发酵工程的微生物大多数都将是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵并进行一系列的代谢调节控制，能获得理想的发酵效果并获得人们需要的各种代谢产物。主要过程包括微生物菌种筛选和改良、菌种培养、发酵、产品提取及分离纯化等。

传统发酵	现代生物技术发酵
天然菌种或化学物理方法 诱变株	基因工程或细胞融合获得 的新菌株
间接测定反应系统中成分 简单控制	利用传感器直接测定 电子计算机控制

现代生物技术发酵与制药技术



武汉大学
Wuhan University

关键是生物技术在工艺中的运用

现代生物技术制药的技术与工程体系现代生物技术制药按照生物工程学科范围分为酶工程制药、细胞工程制药和发酵工程制药3类。

(1) 酶工程制药

是指利用酶的催化作用而制造出具有药用功效物质的技术过程。酶工程制药主要侧重于工程酶的改造。

(2) 发酵工程制药

先将微生物经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌，利用微生物代谢过程生产药物的技术。

(3) 细胞工程制药

利用动、植物细胞培养生产药物的技术。主要体现在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

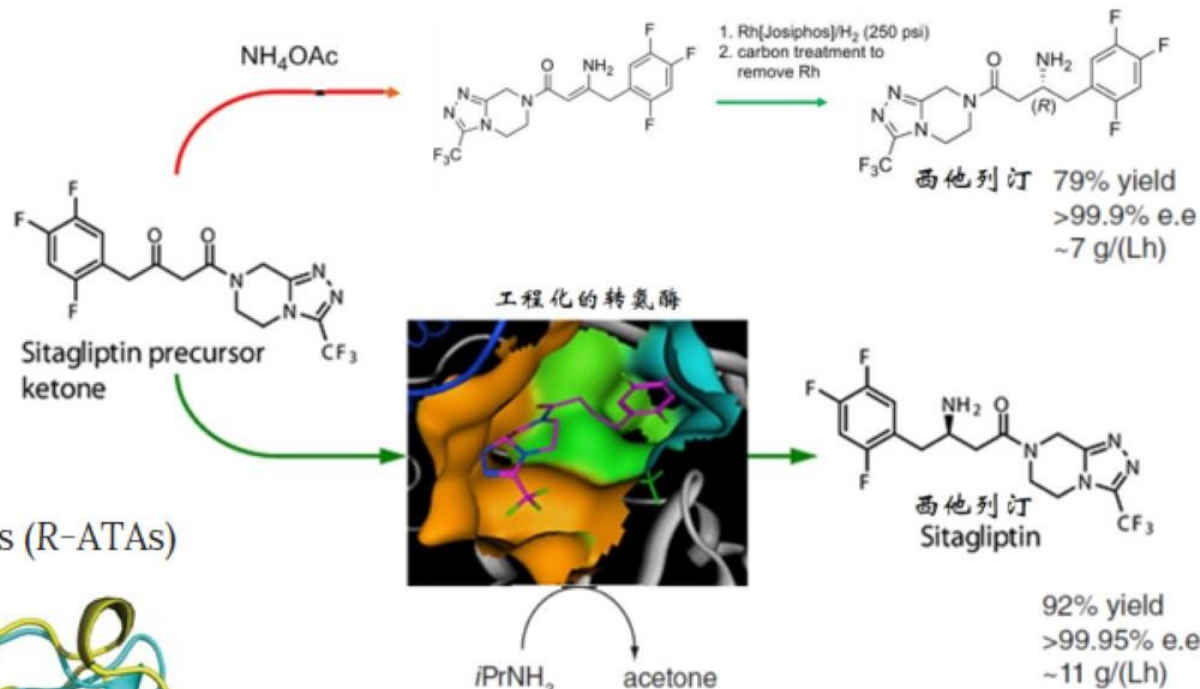
酶工程制药-案例



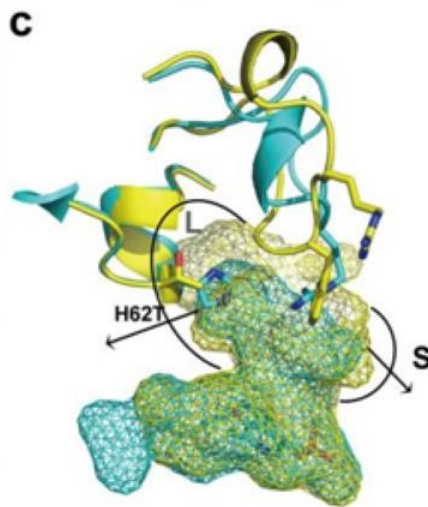
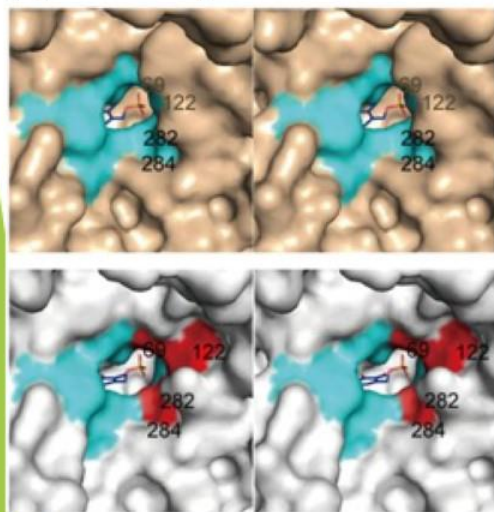
武汉大学
Wuhan University

西他列汀的酶催化路线

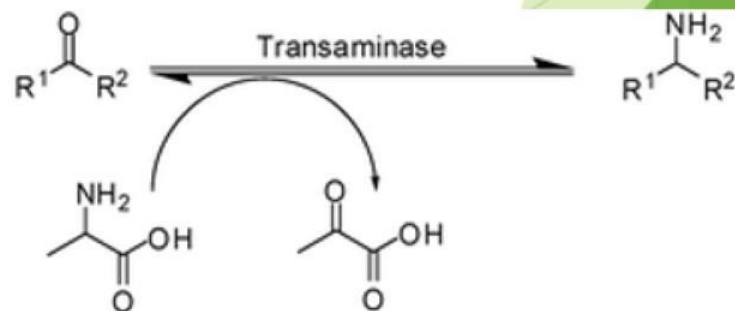
主要通过基因突变、基因工程等技术对工程酶的氨基酸序列进行优化改造，提高催化效率。



(R)-stereospecific amine transaminases (R-ATAs)



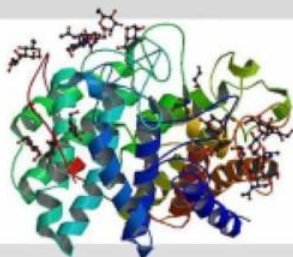
从R-ATA到ATA-117-Rd11的突变进化
提高酶对底物的适宜性
提高催化效率



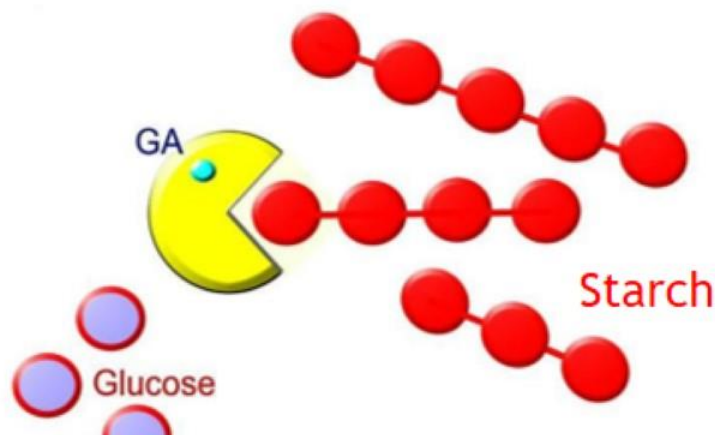


酶工程制药-案例

ENZYME



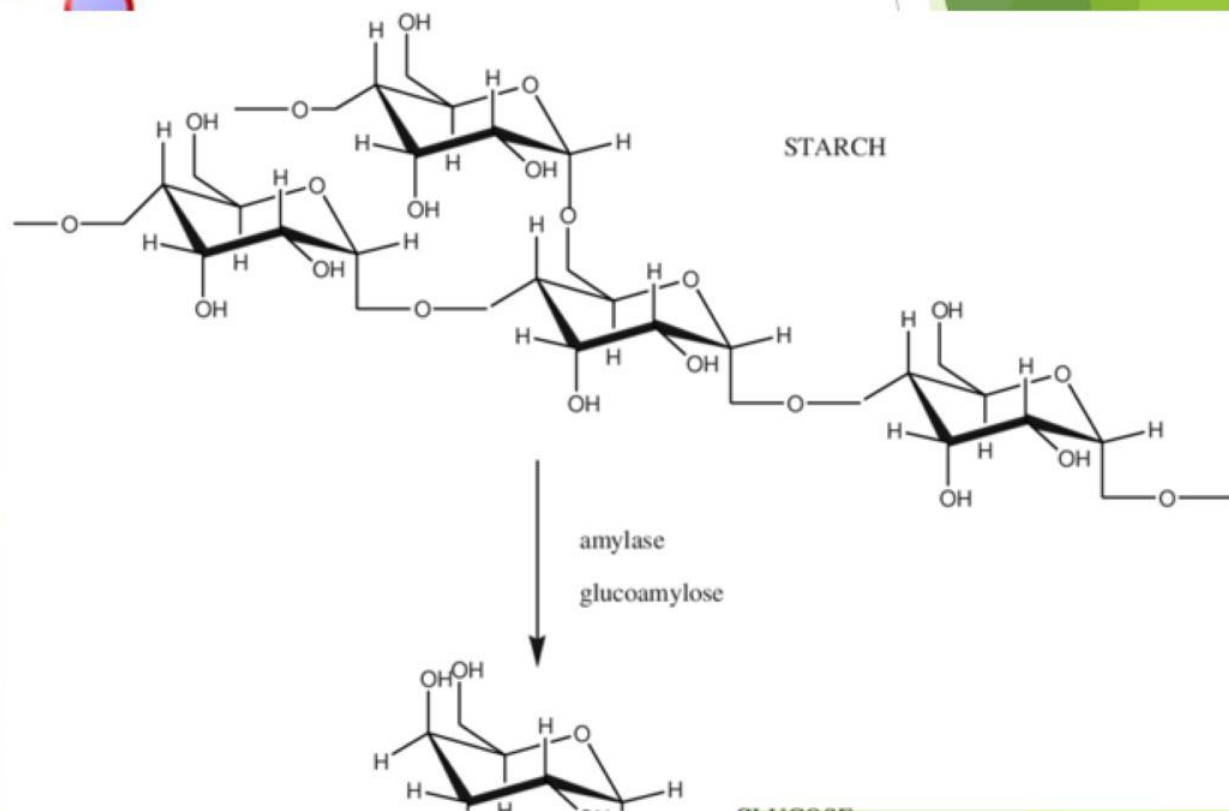
EC # 3.2.1.3



REACTION PARAMETERS

Activity Temperature	30°C-65°C
Optimum emperature	58°C-64°C
Activity pH	3.5-6.0
Optimum pH	4.0-4.8

葡萄糖淀粉酶 Glucoamylase



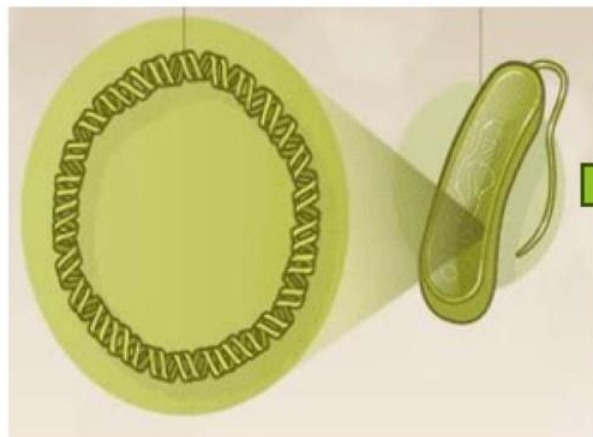
发酵工程制药-案例



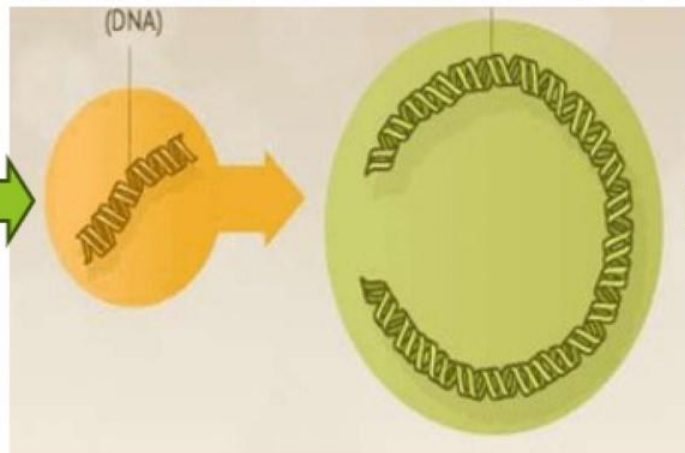
武汉大学
Wuhan University

胰岛素的细菌发酵生产

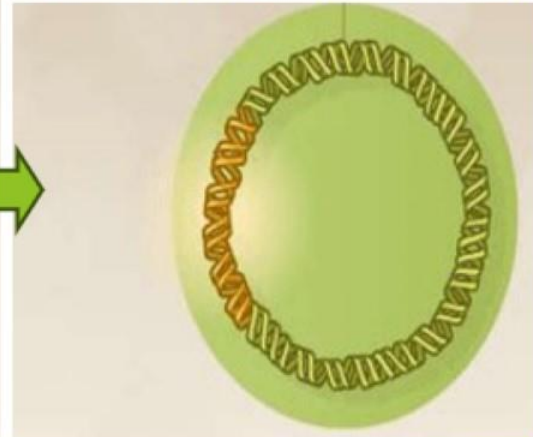
普通细菌不含胰岛素基因



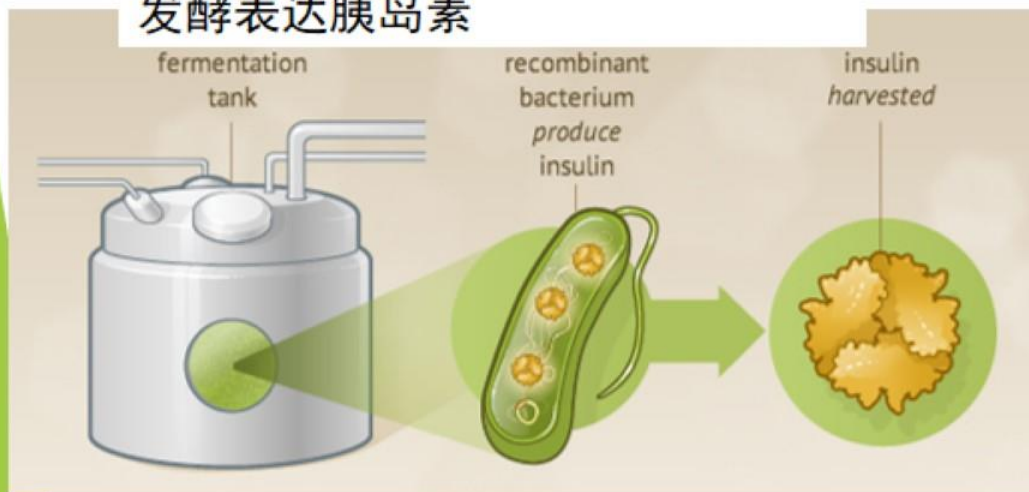
将人胰岛素基因重组入细菌基因



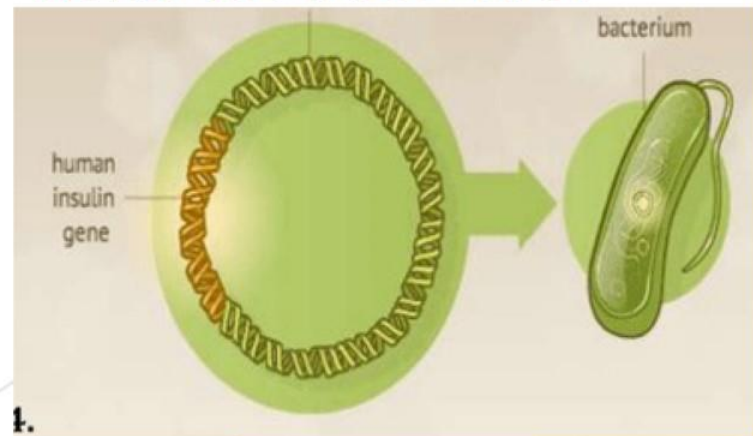
含胰岛素基因的细菌基因



发酵表达胰岛素



将含胰岛素基因导入细菌中



发酵工程制药-案例

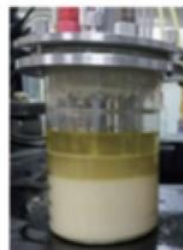
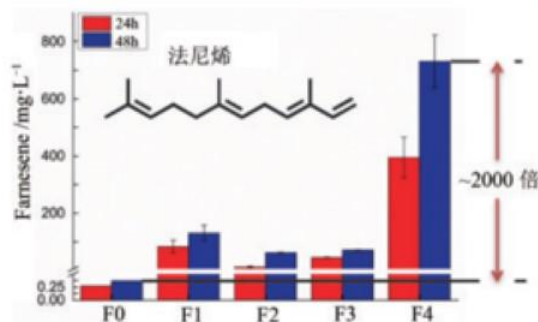
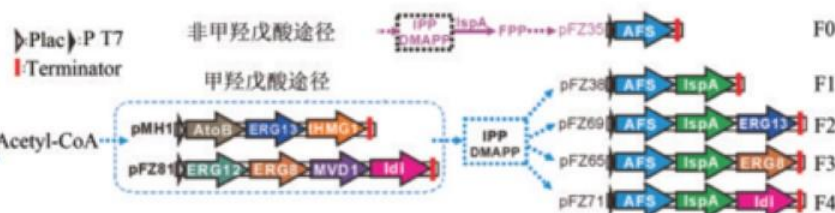


武汉大学
Wuhan University

发酵法制备维生素E (武汉大学刘天罡教授与能特公司)

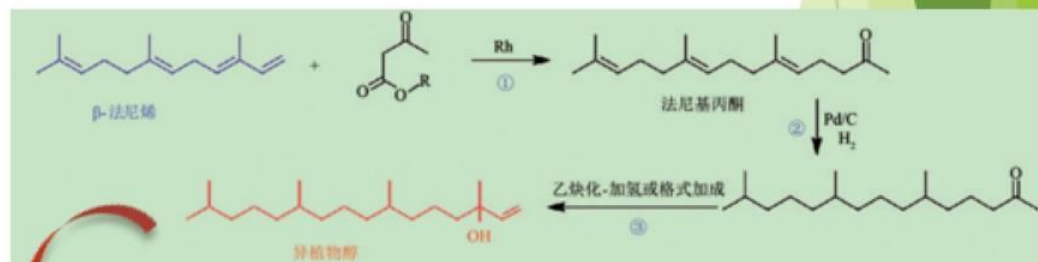
体内定向构建高产菌株

第一步： 发酵制备 法尼烯

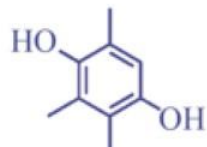


法尼烯

● 化学合成 异植物醇



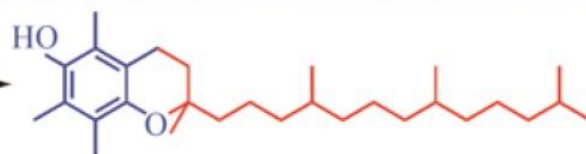
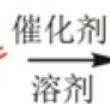
第二步：偶合 制备维生素E



三甲基氢醌



异植物醇



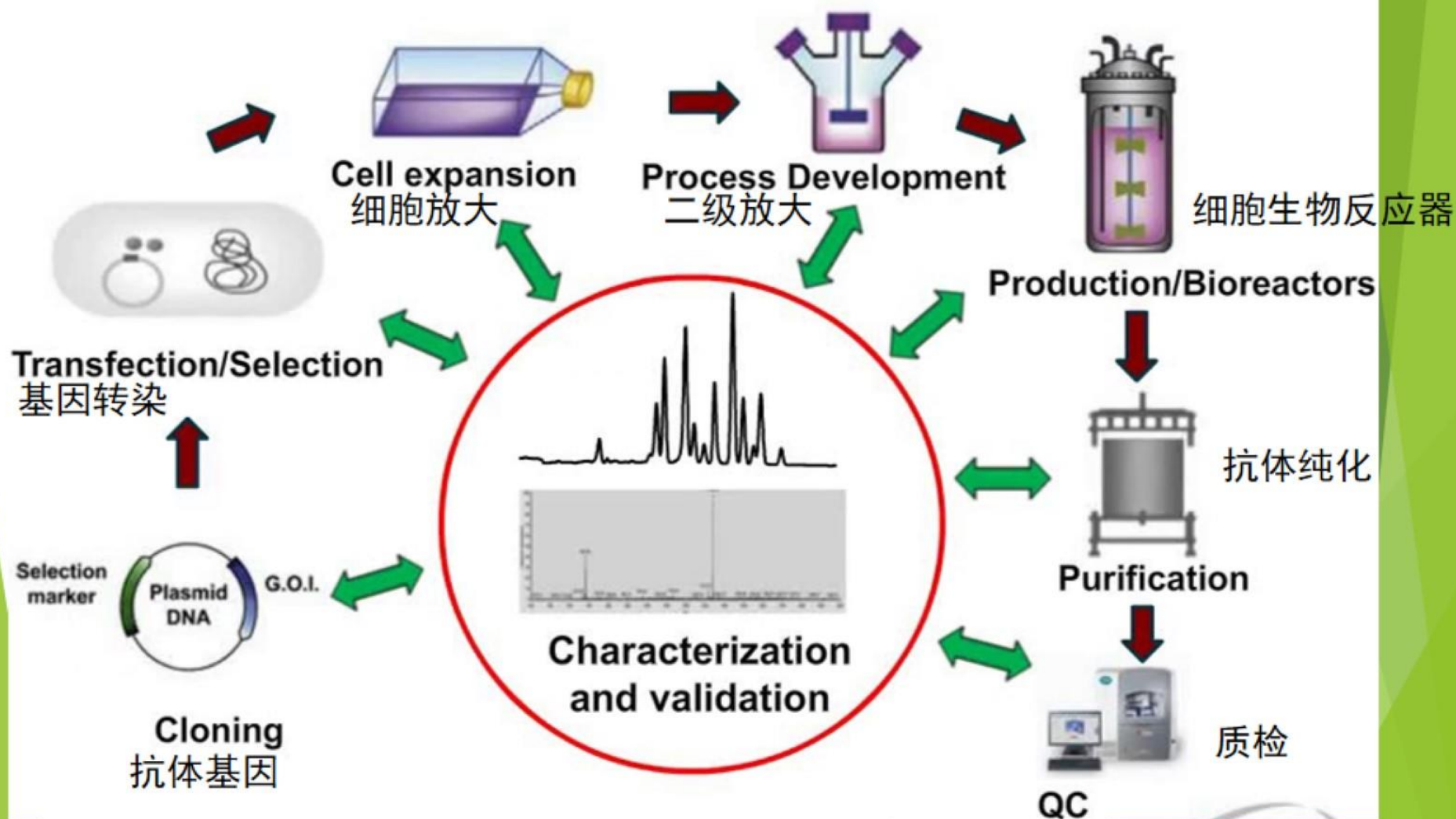
维生素 E

□ 细胞工程制药-案例



武汉大学
Wuhan University

抗体表达生产



基因工程在现代生物技术制药中的地位



武汉大学
Wuhan University

基因工程技术最成功的成就就是用于生物治疗的新型生物药物的研制。

基因工程技术起着非常关键的作用，有着十分重要的地位，主要表现为以下几点：

①利用基因工程技术可大量生产过去难以获得的生理活性蛋白和多肽，为临床使用提供有效的保障；

比如胰岛素，从猪胰腺提取到通过细菌来表达。

②可以提供足够数量的生理活性物质，以便对其生理、生化和结构进行深入的研究，从而扩大这些物质的应用范围；

③用基因工程技术可以发现、挖掘更多的内源性生理活性物质；

④内源性生理活性物质在作为药物使用时存在的不足之处，可以通过基因工程和蛋白质工程进行改造和去除；

⑤利用基因工程技术可获得新型化合物，扩大药物筛选来源。

现代生物技术制药工艺过程



武汉大学

分为上游和下游两个阶段。

- 上游阶段是指构建稳定高效表达的工程菌（或工程细胞）；

外包，CRO

- 下游阶段包括工程菌（细胞）的大规模发酵（培养），产品的分离纯化、制剂和质量控制等一系列工艺过程。

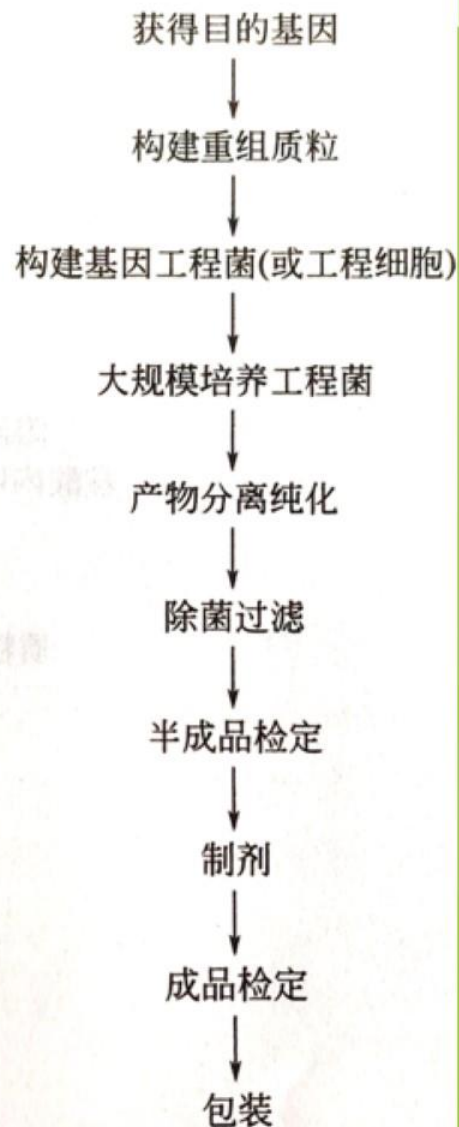


图 4-8 生物技术药物生产的一般过程

基因工程菌的构建



武汉大学
Wuhan University

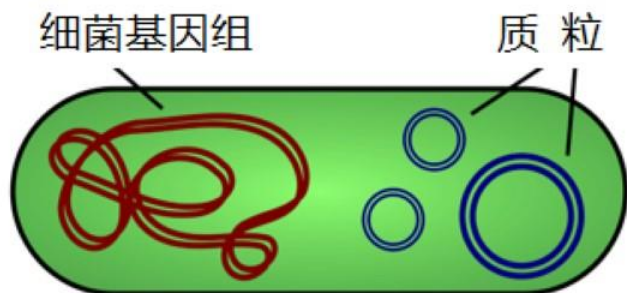
就是将外源性基因转入工程细菌中获得稳定表达的菌株。

(1) 外源目的基因的获得

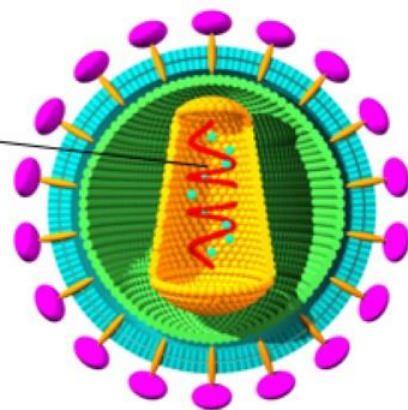
从复杂的生物细胞基因组中，经过酶切消化或PCR扩增等步骤，分离出带有目的基因的DNA片段。；或者从特定细胞里提取所需基因的mRNA后，在适宜的条件下利用逆（反）转录酶的作用来取得所需基因。

(2) 基因运载体的分离提纯

用于装载外源基因，使其在宿主细胞表达。常用的基因运载体主要有两类：一类是质粒；另一类是病毒。



病毒基因



基因工程菌的构建



武汉大学
Wuhan University

(3) 重组DNA分子的形成 (基因重组)

通过专一限制性核酸内切酶的处理或人为的方法,使带有目的基因的外源DNA片段和能够自我复制并具有选择标记的载体DNA分子,产生互补的黏性末端而相互配对结合,并通过连接酶在体外使两者连接起来,形成一个完整的新的DNA分子——重组DNA分子。

EcoR I 酶切位点:

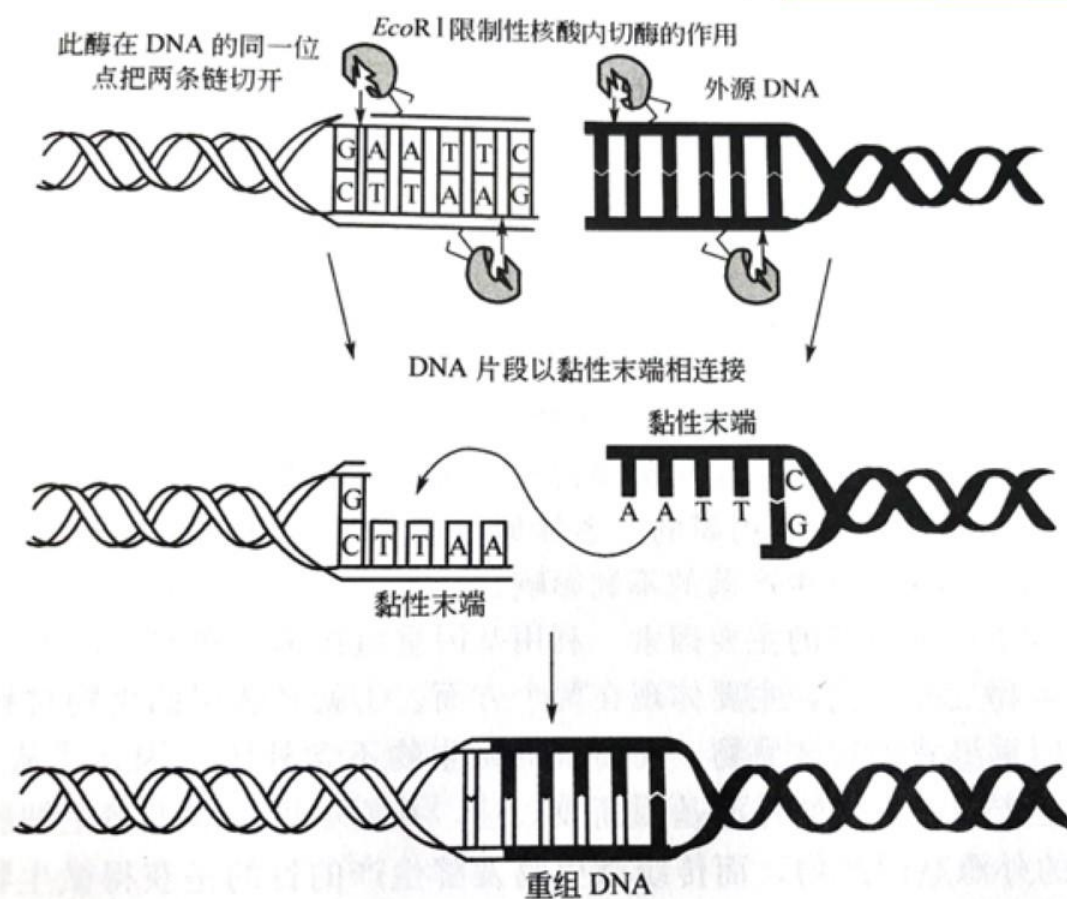


图 4-9 DNA 的体外重组

基因工程菌的构建



(3) 重组DNA分子引入到受体细胞

用人工的方法（转化或转道法）将重组DNA分子转移到适当的受体细胞（宿主细胞）中，通过自体复制和增殖，形成重组DNA的无性繁殖系（即克隆），从而扩增产生大量特定目的基因，并使之得到表达，即能指导蛋白质的合成。转化法导入胰岛素基因即是较为典型的例子。

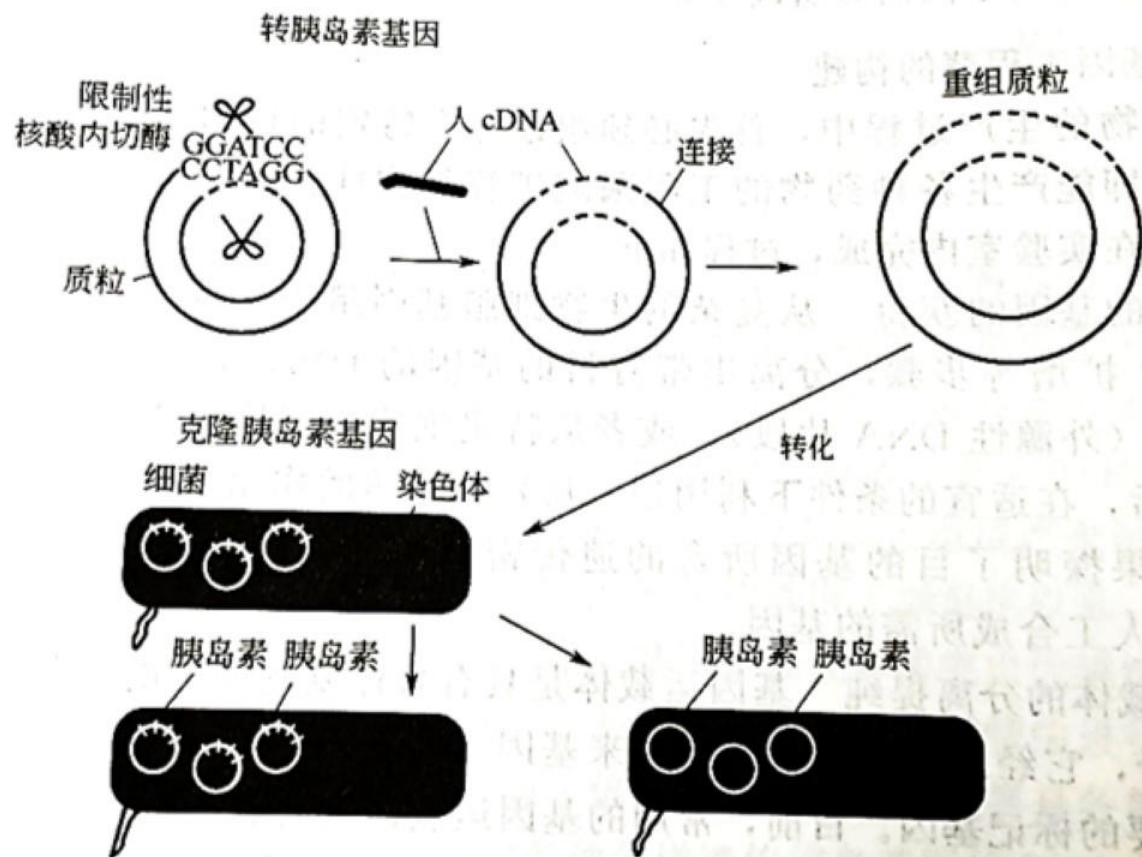


图 4-10 转化法导入胰岛素基因

基因工程菌的构建



(5) 重组菌的筛选、鉴定和分析

从扩增的大量受体菌中设法筛选出带有目的基因的重组菌（克隆株系），并进行鉴定。然后培养克隆株系，提取出重组质粒，分离已经得到扩增的目的基因，再分析测定其基因顺序。

(6) 工程菌的获得

将得到的目的基因克隆到表达载体上，再次导入到受体菌中，经反复筛选、鉴定和分析测定，最终获得较稳定的能高效表达的基因工程菌。

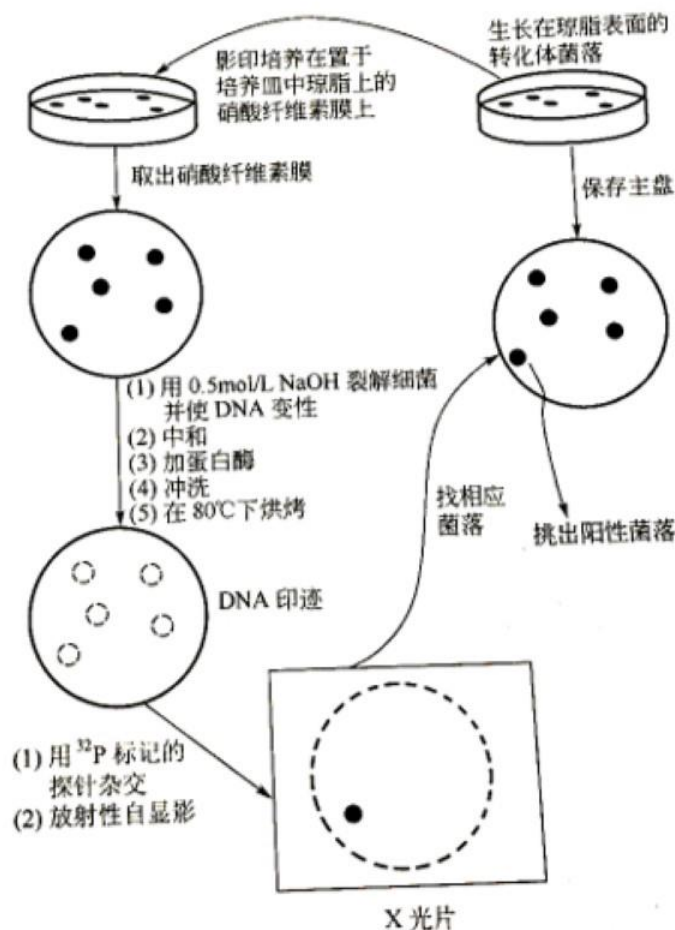


图 4-11 菌落的原位杂交筛选过程



工程菌的发酵生产

(1) 基因工程菌的培养方式

主要是间歇发酵，连续发酵和流加发酵

其它模式：

①补料分批培养

补料分批培养是将种子接入发酵反应器中进行培养，经过一段时间后，间歇或连续地补加新鲜培养基，使菌体进一步生长的培养方法。

②连续培养

连续培养是将种子接入发酵反应器中，搅拌培养至一定菌体浓度后，开动进料和出料的蠕动泵，以控制一定稀释率进行不间断地培养。

③透析培养

透析培养是利用膜的半透性原理使代谢产物和培养基分离，通过去除培养液中的代谢产物来解除其对生产菌的不利影响

工程菌的发酵生产



武汉大学
Wuhan University

(2) 影响基因工程菌发酵的主要因素

- ①就其选用的生物材料而言，基因工程菌是带外源基因重组载体的微生物，而传统的微生物不含外源基因。
- ②从发酵工艺考虑，基因工程菌发酵生产的目的是使外源基因高效表达，并要尽可能减少宿主细胞本身蛋白的污染，以获得大量的外源基因产物，而传统微生物发酵生产的目的是获得微生物自身基因表达所产生的初级或次级代谢产物。

影响基因工程菌发酵的几个主要因素是：

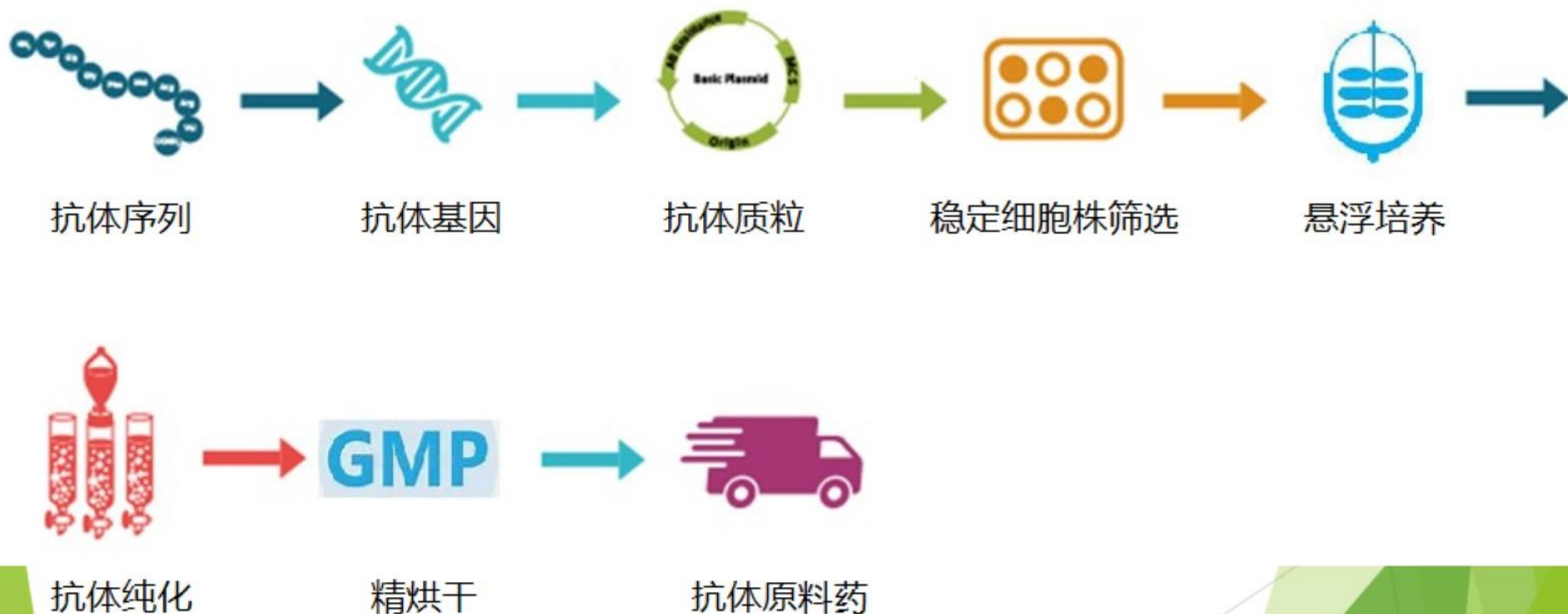
- 培养基的组成，
- 接种量的大小，
- 温度的高低，
- 溶解氧的浓度，
- 诱导时机及pH。

抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

工程细胞生产生物药物的流程



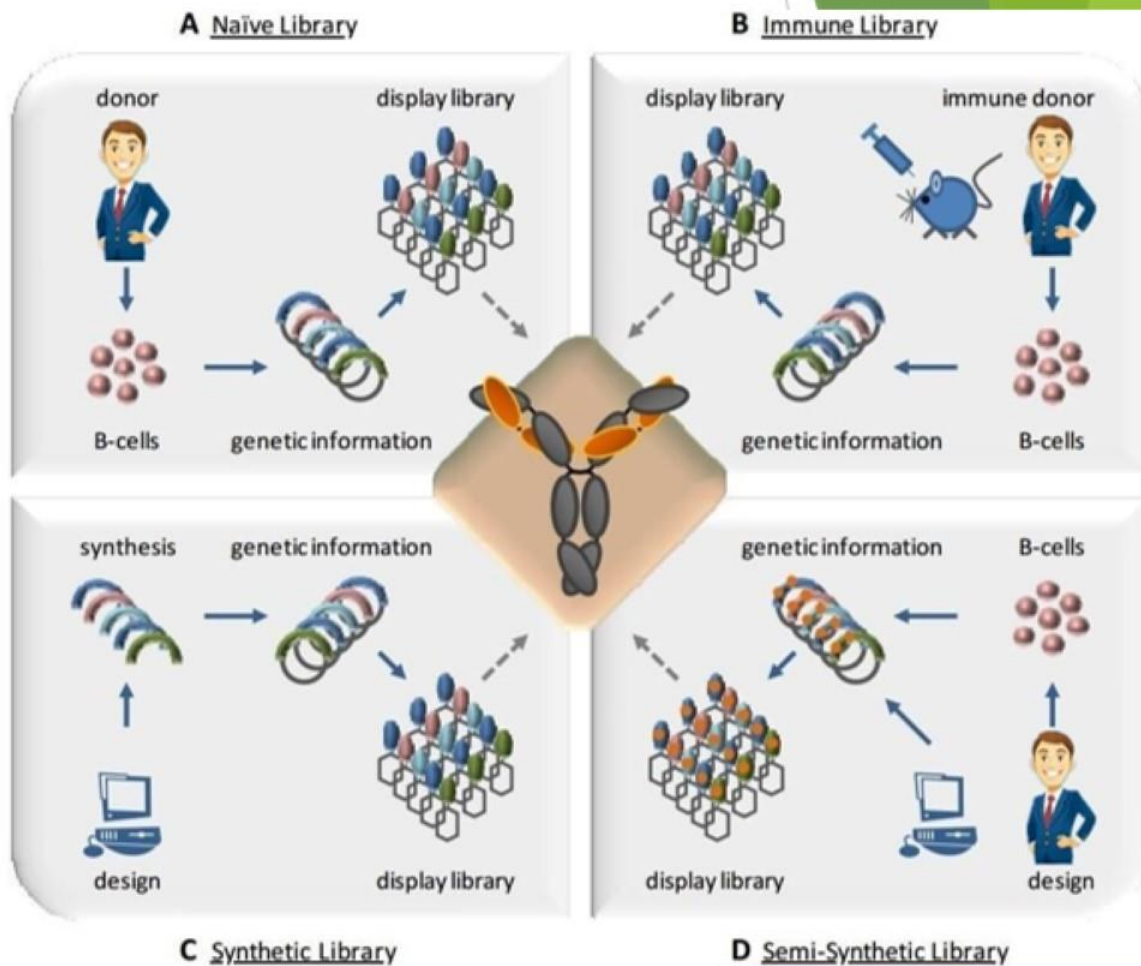
抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

(1) 抗体序列的获得

- 从病人B细胞获得
- 通过免疫老鼠等动物获得
- 通过合成噬菌体筛选获得
- 通过计算机合理设计获得



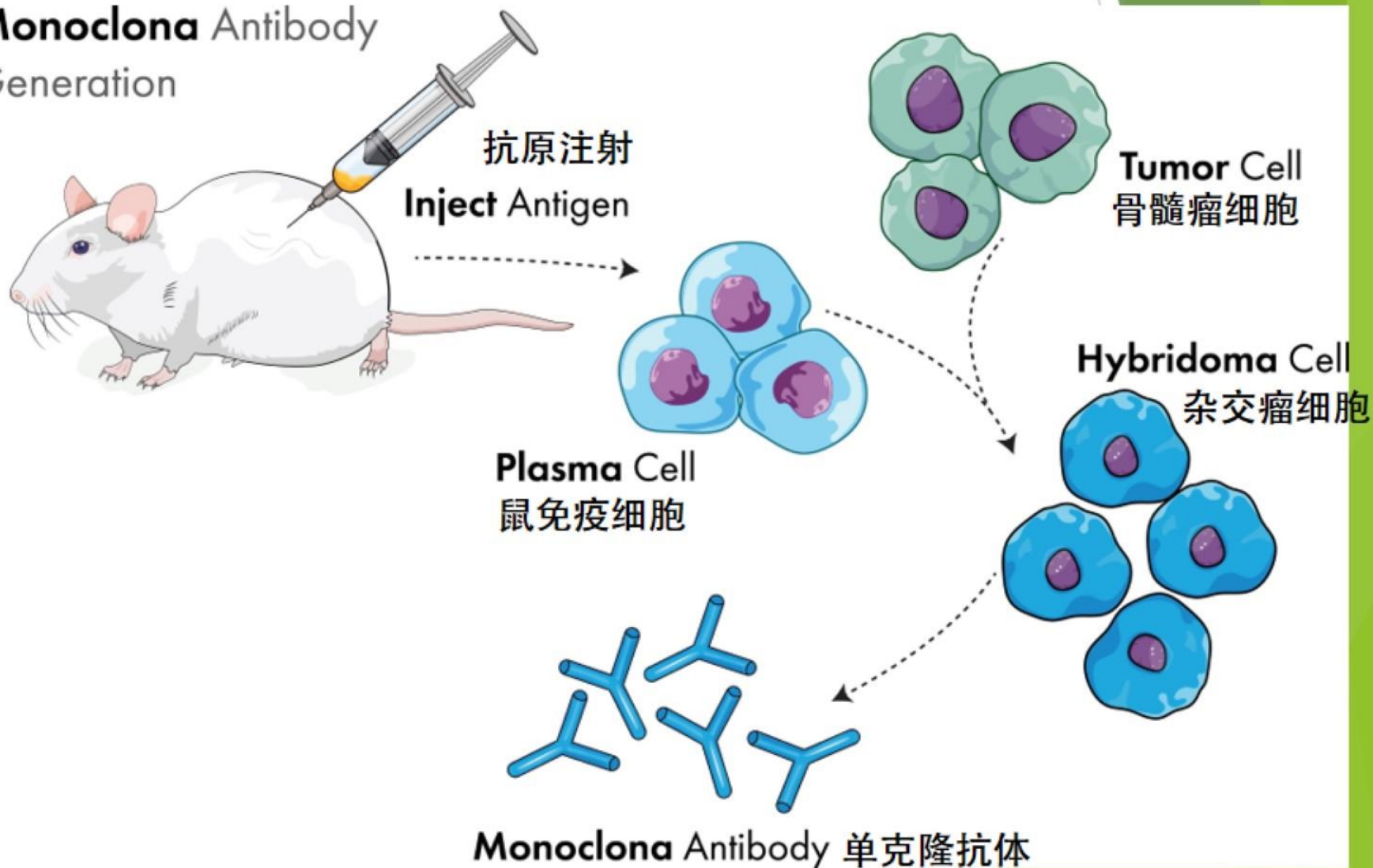
抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

抗体序列的获得：免疫动物法

Monoclonal Antibody Generation



抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

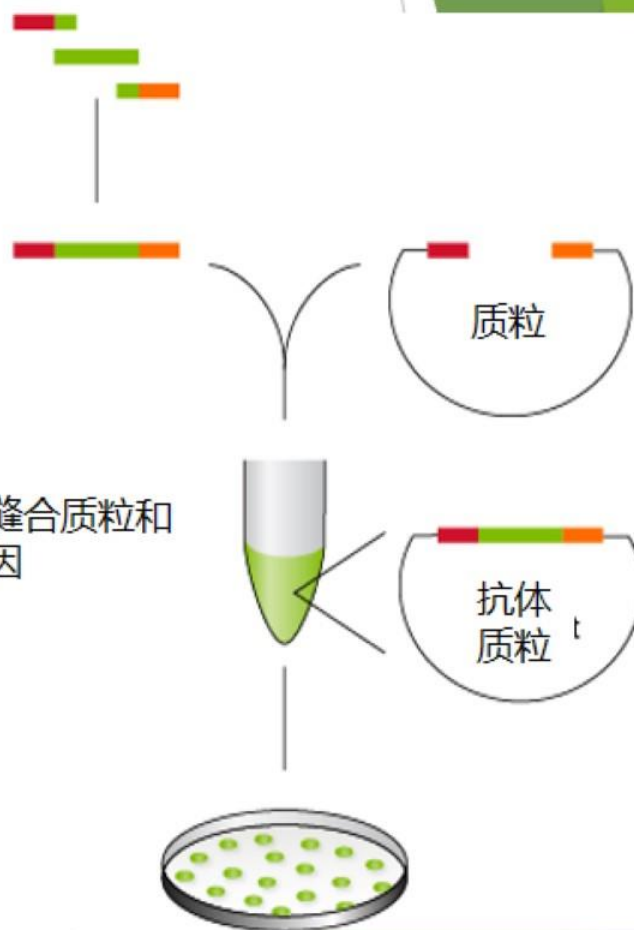
(2) DNA重组抗体表达载体

将抗体基因分子克隆进入
抗体表达质粒，挑选正确的克隆，
得到DNA重组抗体表达载体

PCR放大抗体
基因

限制性酶切
PCR基因片
段

连接酶缝合质粒和
抗体基因



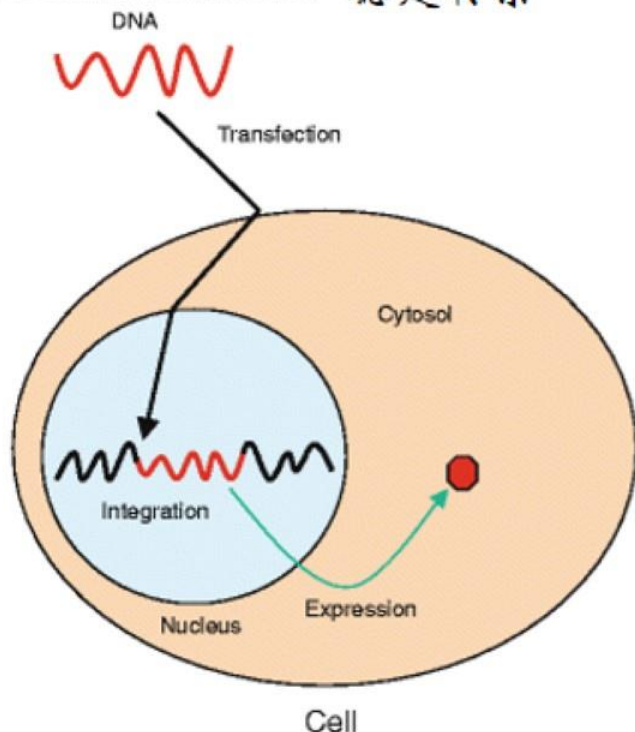
抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

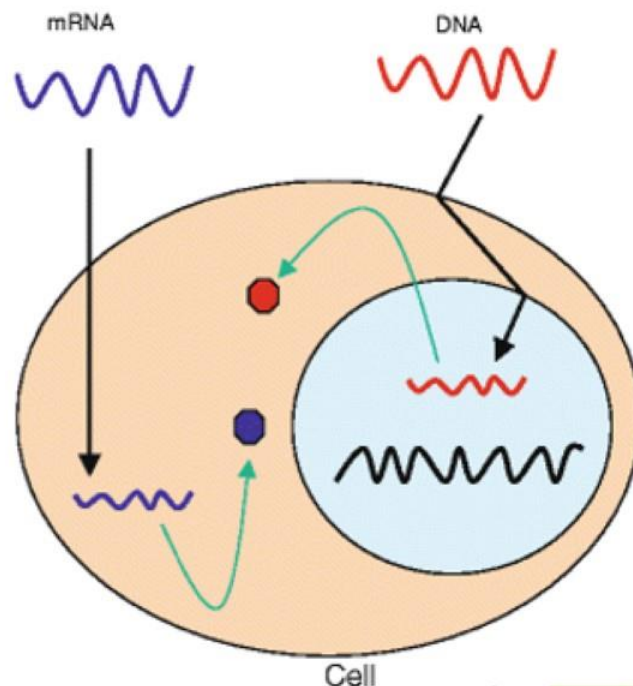
(2) 抗体基因融入细胞基因组中

A. Stable transfection 稳定转染



外源基因转入细胞内，在细胞的繁殖过程中，外源基因有很小的概率会嵌入细胞基因组中，这样外源基因就可以随着细胞的繁殖而自我复制，保持稳定的表达抗体。

B. Transient transfection 瞬时转染



抗体只可以表达一段时间。外源基因转入细胞内，外源基因载体不能复制，随着细胞的繁殖，外源基因越来越少，直到丢失。

抗体表达工程细胞的构建

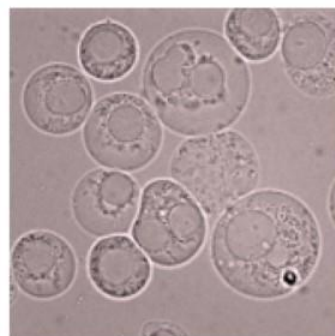


武汉大学
Wuhan University

(3) 抗体表达细胞的选择

抗体工业生产中最常见的表达细胞：

- CHO细胞株（中国仓鼠卵巢细胞）
约表达了75%的药用抗体
- HEK293细胞株



CHO细胞

所有的抗体表达细胞为哺乳动物悬浮细胞。

- 哺乳动物细胞和人近源，表达的抗体和人体本身的抗体更接近；
- 悬浮细胞可以达到很高的细胞浓度，相应可以在很小的培养体积下得到大量细胞和抗体。

抗体在悬浮细胞内合成，然后分泌到培养基中，收集培养基就可以纯化得到抗体。

抗体表达工程细胞的构建



武汉大学
Wuhan University

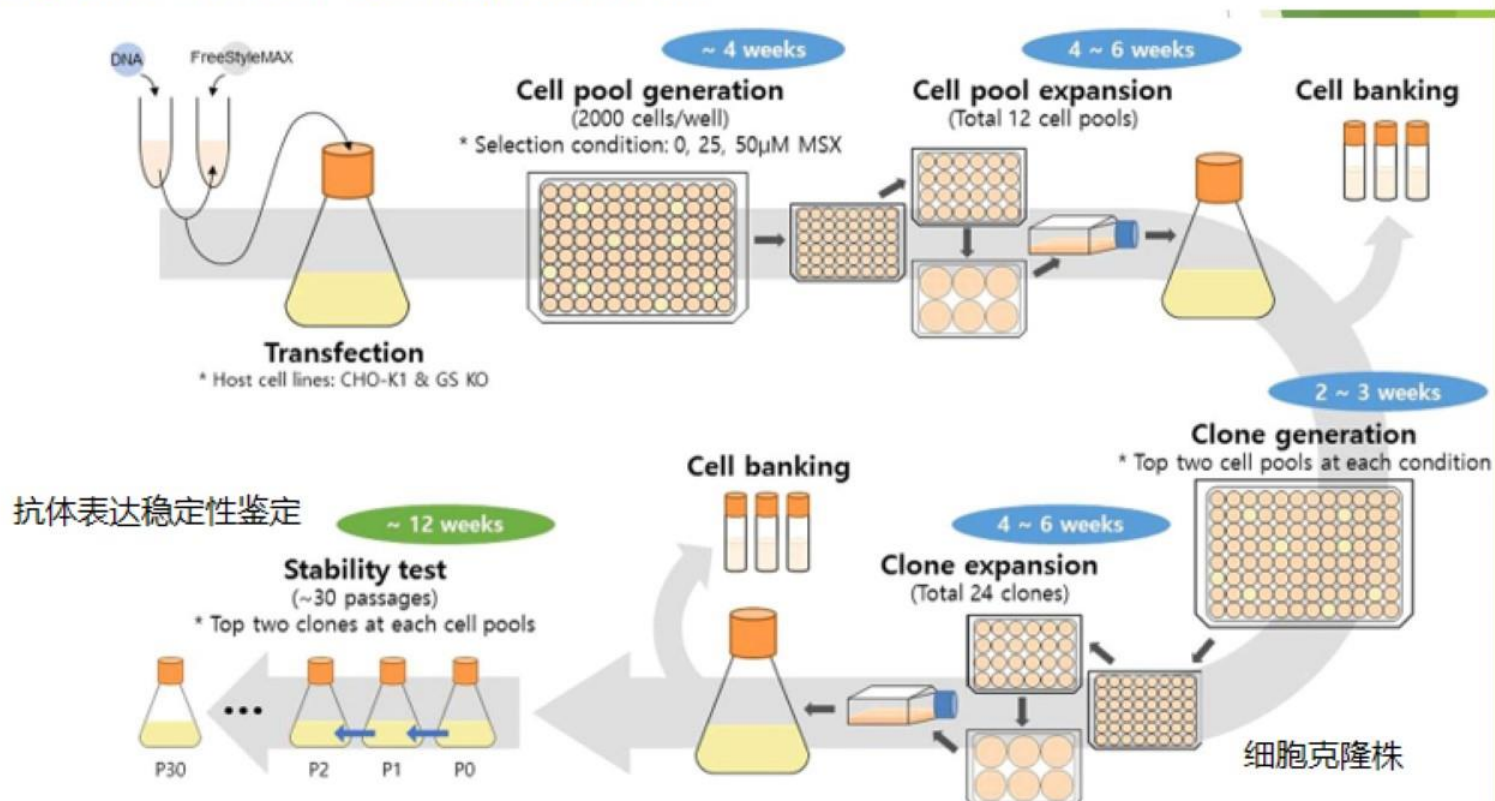
(4) 稳定态细胞的构建和筛选鉴定

每一种抗体对应于一种表达该抗体的CHO细胞株，要大量表达该抗体，必须获得稳定表达该抗体的细胞，即稳定态细胞。

工业级大量表达抗体需要将抗体基因融合到细胞基因组中，让细胞可以稳定表达抗体。

抗体基因融入细胞基因组的位置具有随机性，只有插入合适的位置才可以稳定表达抗体基因。

需要筛选最好的单细胞克隆，验证最稳定的表达株。



抗体表达工程细胞培养基



武汉大学
Wuhan University



主要成分（不能含血清）

- ① 20种氨基酸
- ② 各种维生素
- ③ 无机缓冲盐
- ④ 微量元素成分
- ⑤ 生长激素或者刺激分子
- ⑥ 表面活性剂

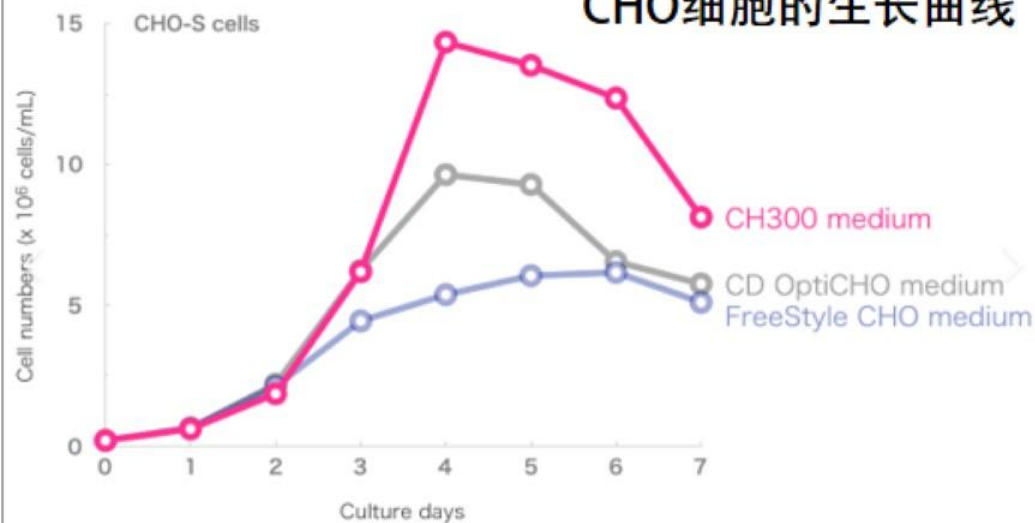


抗体培养基的筛选配制和生产



武汉大学
Wuhan University

CHO细胞的生长曲线



生物反应器



工程细胞的培养设备

CHO细胞的生长曲线和密度也与培育环境有关



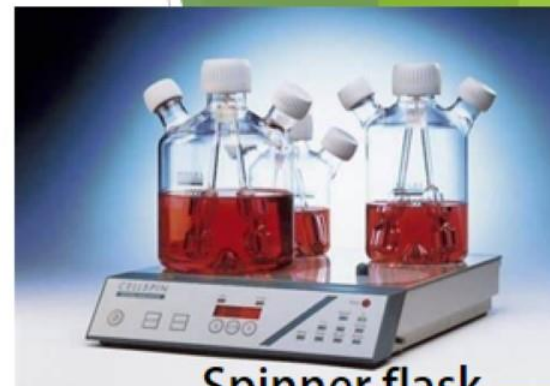
武汉大学
Wuhan University



贴壁培养箱



细胞摇床



Spinner flask



Wavebag



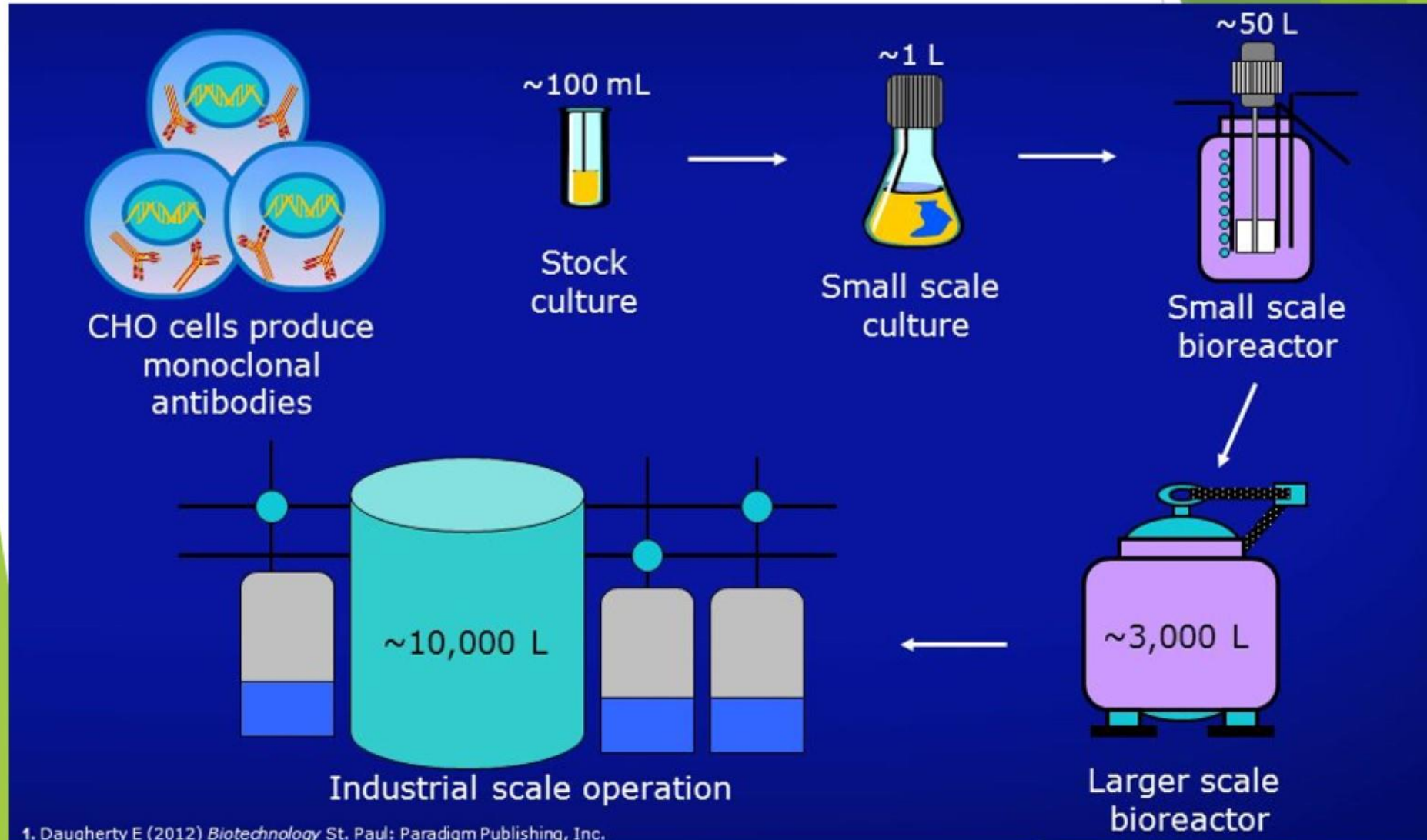
生物反应器

基因工程细胞的大规模生产



武汉大学
Wuhan University

CHO工程细胞分批放大



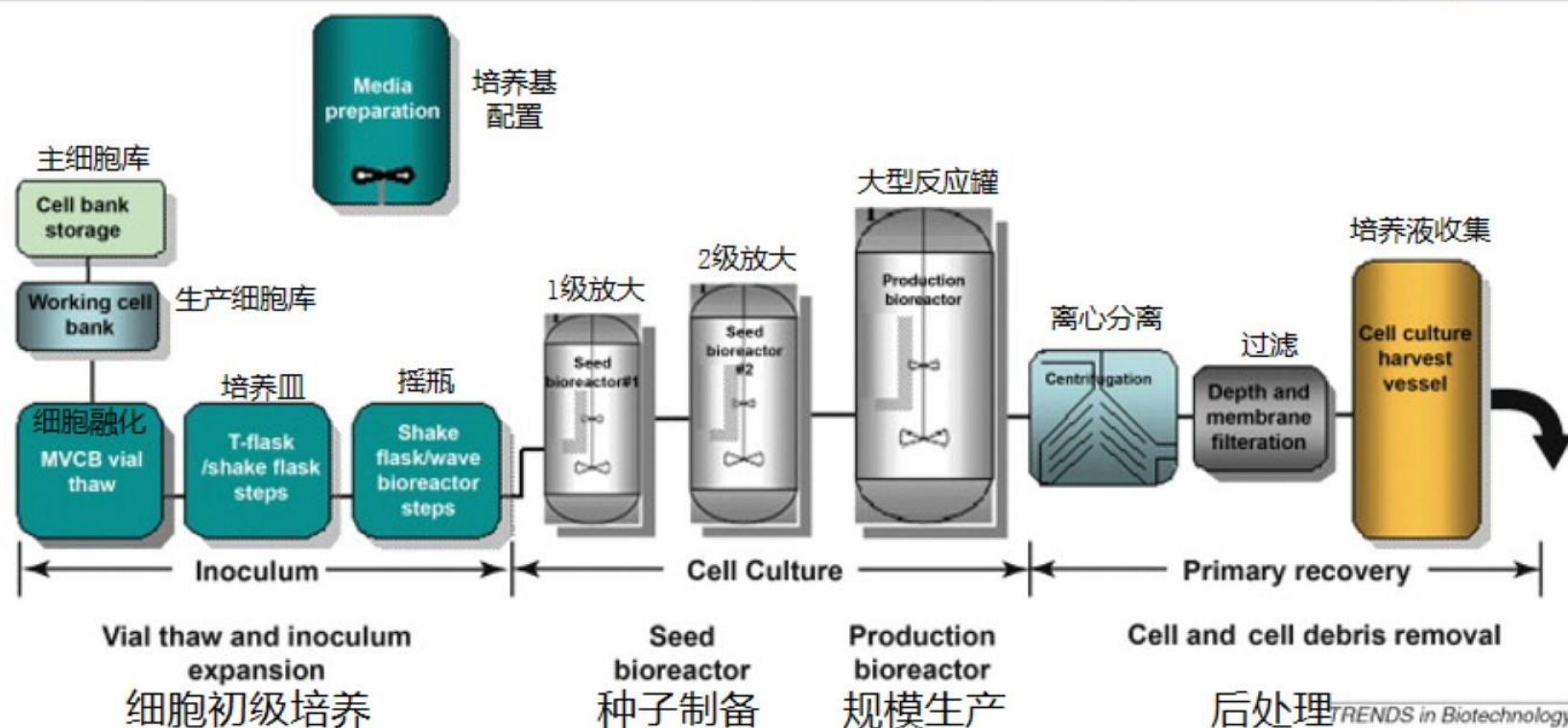
基因工程细胞的大规模生产



武汉大学
Wuhan University

基因工程细胞规模生产抗体总流程

GMP细胞库





世界上最大的抗体生产车间-韩国三星生物制药车间

三星集团投资30亿美元建成了世界最大的抗体药代工生产车间。





细胞库的建立与鉴定

生产应采用种子批 (Seed Lot) 系统, 从已建立的**主细胞库** (Master Cell Bank) 中, 再进一步建立**生产细胞库** (WCB, working cell bank)。

- 避免交叉污染:

在同一实验工作区, 不得同时操作两种不同细胞 (菌种); 一个工作人员也不得同时操作两种不同细胞或菌种。

- 细胞种记录

应详细记录种子材料的来源、方式、保存及预计使用寿命。

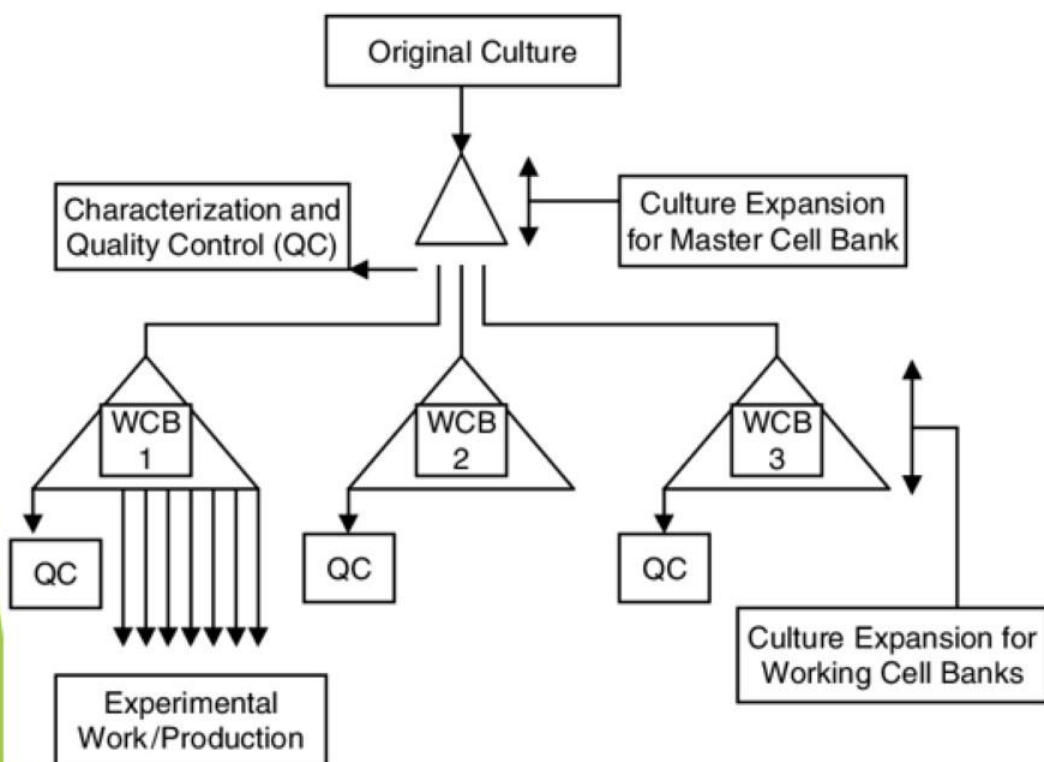
- 高等真核细胞用于生产时, 应对所建立的种子进行细胞的鉴别标志。

- 种子细胞的致癌性, 是否感染有致病病毒等

工业生产中的二级细胞库系统



武汉大学
Wuhan University





制造过程的控制

(1) **有限代次**生产控制 用于培养和诱导基因产物的材料和方法应有详细资料，对培养过程及收获时，应有灵敏的检测措施控制微生物污染。

- 应提供培养生长浓度和产量恒定性方面的数据，并应确立废弃一批培养物的指标。
- 根据宿主细胞/载体系统的稳定性资料，确定在生产过程中允许的最高细胞倍增数或传代代次，并应提供最适培养条件的详细资料
- 生产周期结束时，应监测宿主细胞/载体系统的特性。



制造过程的控制

(2) 连续培养生产控制

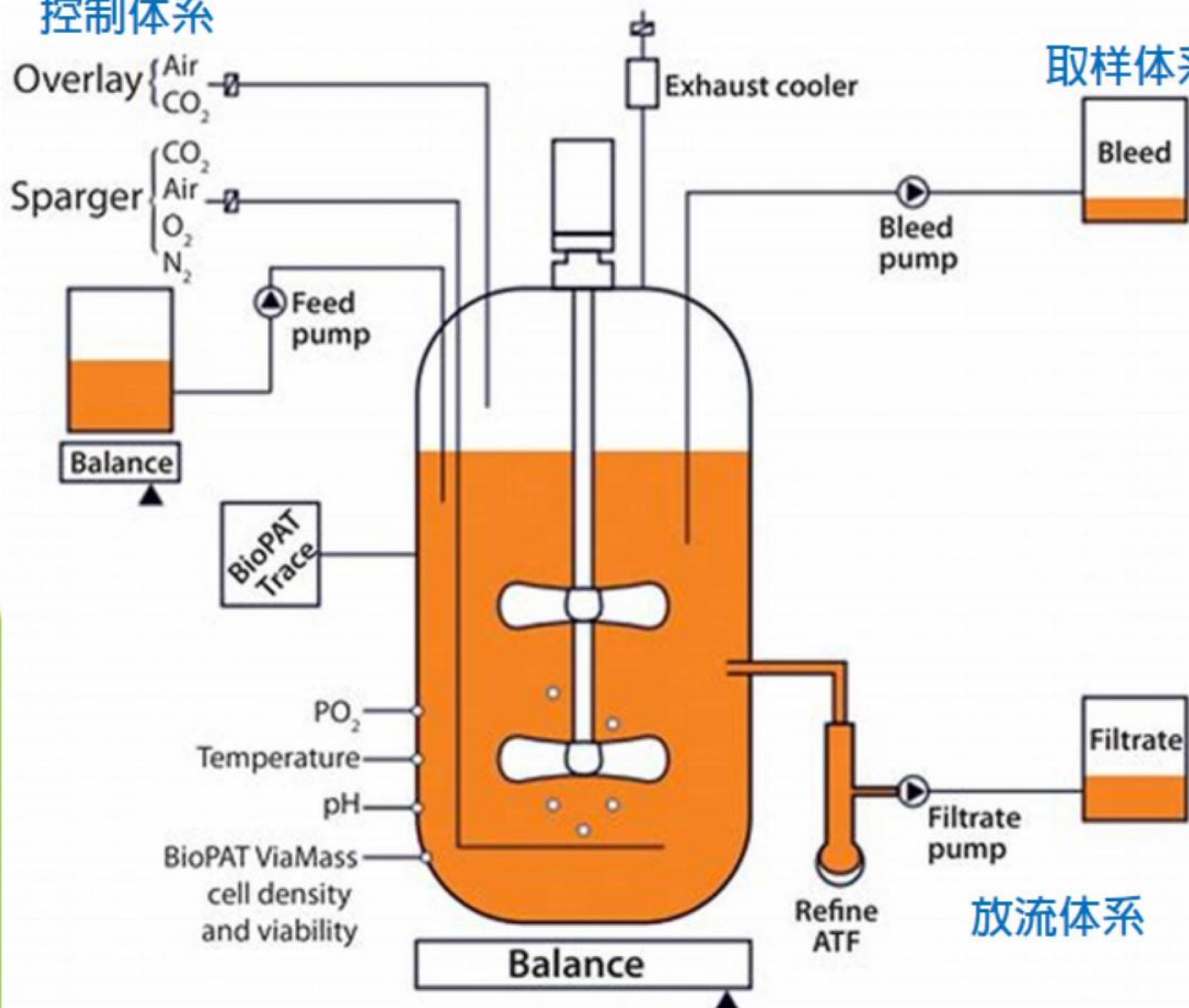
- 应提供经长期培养后所表达基因的分子完整性资料，以及宿主细胞的表型和基因型特征。每批培养的产量变化应在规定范围内。
- 对可以进行后处理及应废弃的培养物，应确定指标。
- 从培养开始至收获，应有灵敏的检查微生物污染的措施。
- 根据宿主/载体稳定性及表达产物的恒定资料，应规定连续培养的时间。如属长时间连续培养，应根据宿主/载体稳定性及产物特性的资料，在不同培养间隔时间做全面检定。



生物药发酵生产的环境控制

生物反应罐的环境控制

控制体系



发泡问题

泡沫隔绝了空气和氧气，不利于细胞生长。

生物药发酵生产的环境控制

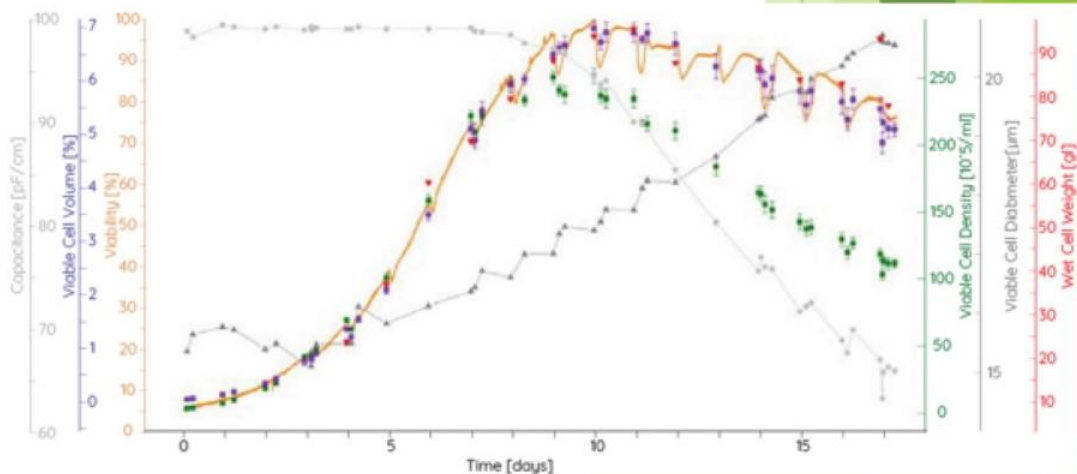


武汉大学
Wuhan University

取样



细胞发酵生产的投入成本巨大，
密切监测反应罐中的各种参数。

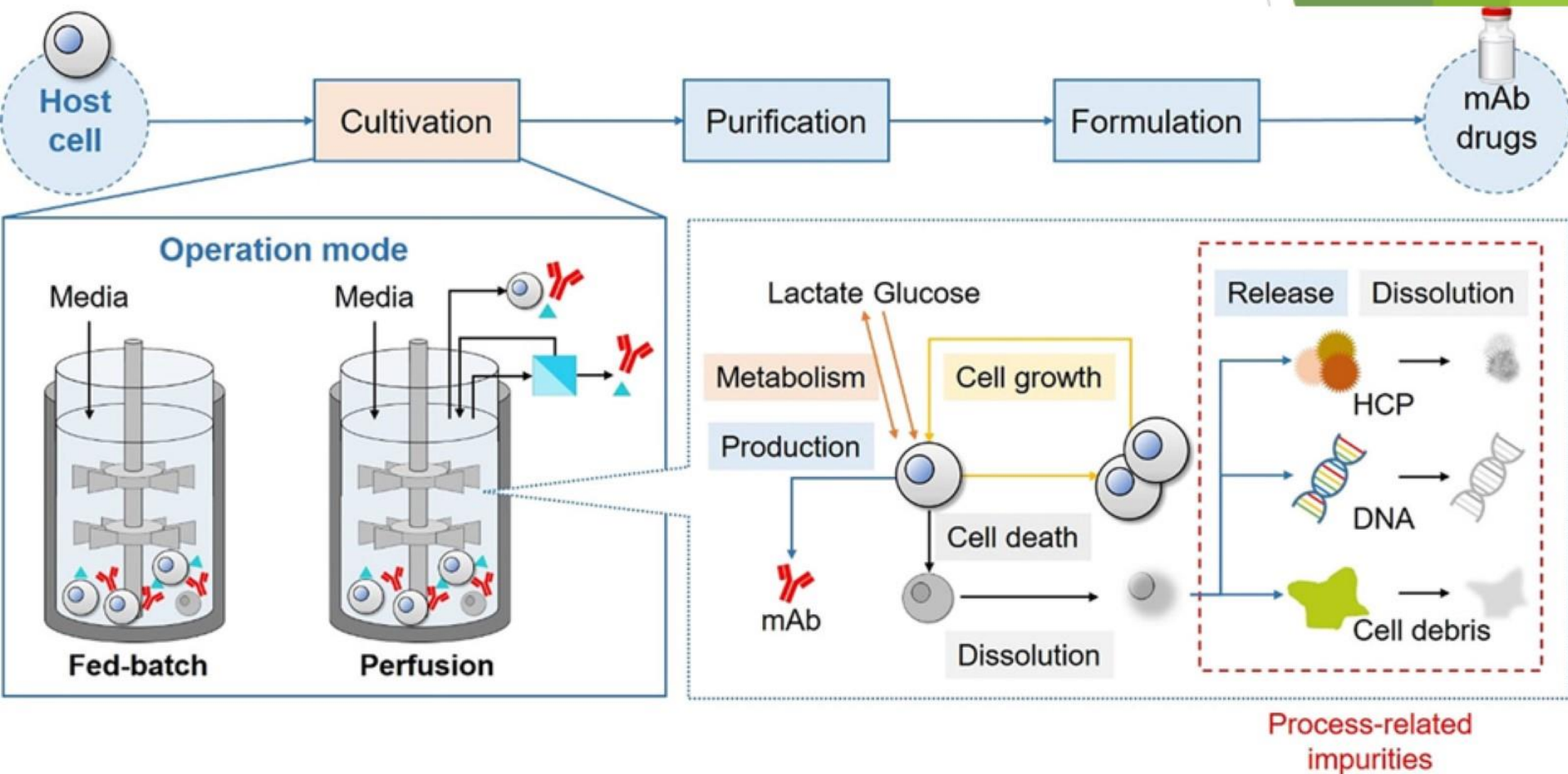


生物药发酵生产的环境控制



武汉大学
Wuhan University

发酵罐内微环境的控制

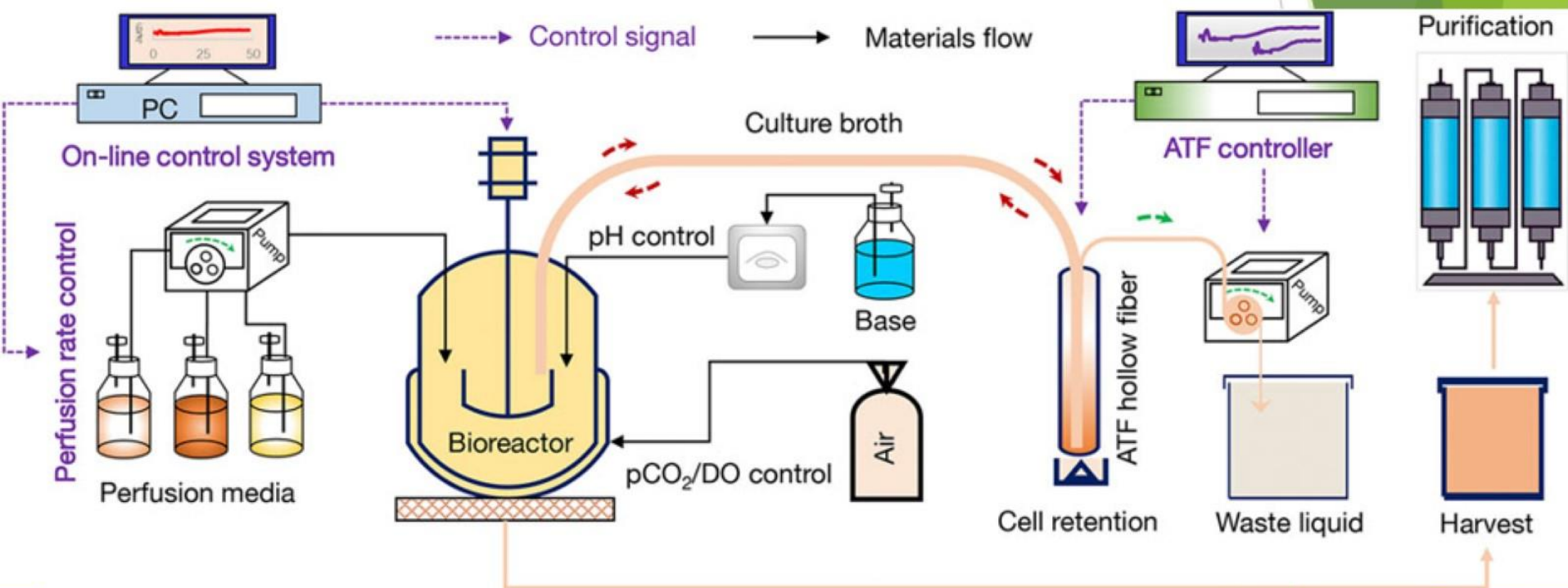


生物药发酵生产的环境控制



武汉大学
Wuhan University

发酵体系的控制



生物药发酵生产的环境控制



武汉大学
Wuhan University

设备和厂房的无菌无尘



Source: Sartorius AG

制造过程的控制

(3) 纯化工艺过程的质量控制

- 对整个纯化工艺应进行全面研究，包括能够去除宿主细胞蛋白、核酸、糖、病毒或其他杂质以及有害化学物质等。
- 纯化方法的设计应考虑到尽量去除污染病毒、核酸、宿主细胞、杂蛋白、糖、其他杂质以及纯化过程带入的有害物质。
- 对于收获、分离和纯化的方法步骤应做详细记录，应特别注意污染病毒、核酸以及有害抗原性物质的去除。
- 若用亲和色谱技术，例如，单克隆抗体，应有检测可能污染此类外源物质的方法，不应含有可测出的异种免疫球蛋白，柱色谱配制溶液用水一律使用超纯水。



生物技术药物分离纯化的基本过程

工程菌产物的分离纯化一般包括细胞破碎、固液分离、浓缩与初步纯化（分离）、高度纯化直至得到纯品以及成品加工等步骤。

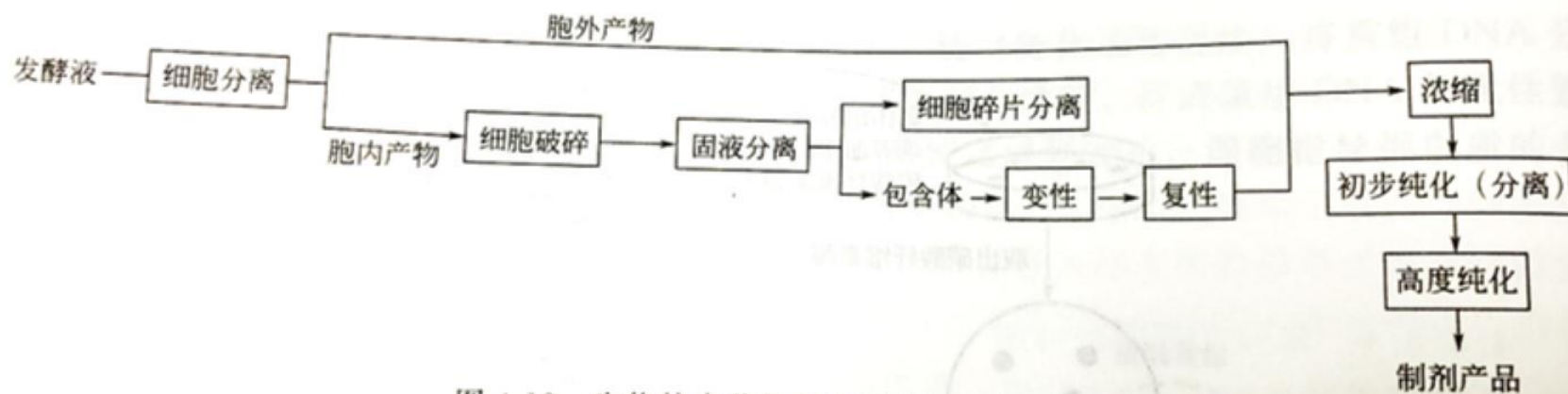


图 4-12 生物技术药物分离纯化的一般流程

分离纯化过程采用的技术



武汉大学
Wuhan University

①细胞收集技术

细胞收集常用离心分离的方法，膜过滤法也逐渐得到广泛应用。

②细胞破碎技术 （适宜于胞内表达的蛋白）

细胞破碎的目的是破坏细胞外围使胞内物质释放出来（针对胞内产物而言）。细胞破碎是提取胞内产物的关键步骤，它影响产物的活性、收率和成本，因而引起了基因工程和生化工程学者的广泛关注。目前细胞破碎方法主要有机械破碎法和非机械破碎法两大类。可以根据生产规模和活性蛋白质在细胞中的位置，选择适当的方法。

③固液分离技术

固液分离技术主要有离心、膜过滤和双水相分配技术。目前固液分离中对细胞碎片的分离是生化固液分离中最困难的操作。

④色谱技术

色谱技术是医药生物技术下游精制阶段的常用手段。主要有离子交换色谱、疏水色谱、反相色谱、亲和色谱、凝胶过滤色谱、高压液相色谱等。

生物技术药物的分离纯化



武汉大学
Wuhan University

在生物技术药物的生产中，其分离纯化的费用占整个生产费用的很大一部分，因此分离纯化是生物技术药物生产中极其重要的一环。

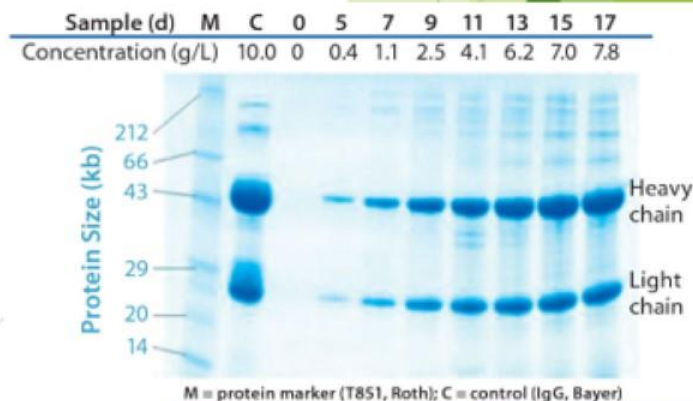
分离柱的填料非常昂贵。

工业生产需要很大的分离柱来完成大规模分离。

分离柱可重复利用。

由于工程细胞经过大规模培养后，产生的有效成分含量很低（1~10g/L），杂质含量和种类却很高和很多；另外由于生物技术药物是从转化细胞，而不是从正常细胞生产的，所以对产品的纯度要求也高于传统产品。分离纯化要比传统产品困难得多。

培养基还有数百中化学成分，细胞可分泌数百种其他蛋白质，虽然抗体占主要成分。

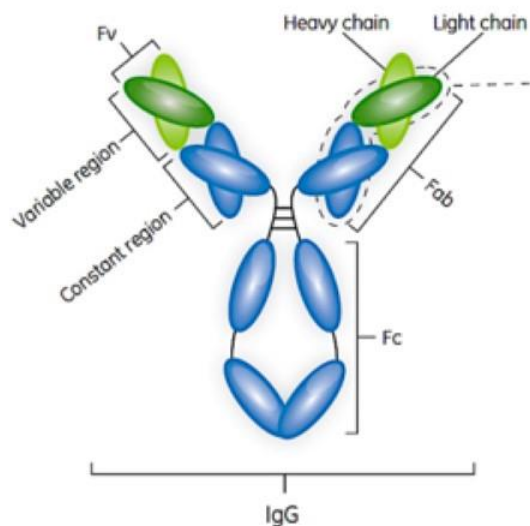


生物药的亲和纯化技术



武汉大学
Wuhan University

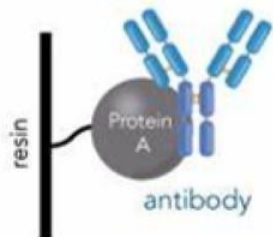
抗体药的纯化



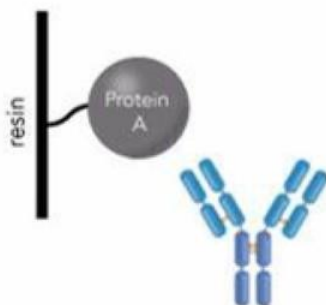
抗体的Fc结构域可以在中性条件下与Protein A蛋白亲和结合，酸性下洗脱下来，从而去除其它杂质。



pH 7.2 - 7.4
neutral pH
Antibody is bound
中性下结合



pH 2.7
acidic pH
Antibody is released
酸性下洗脱



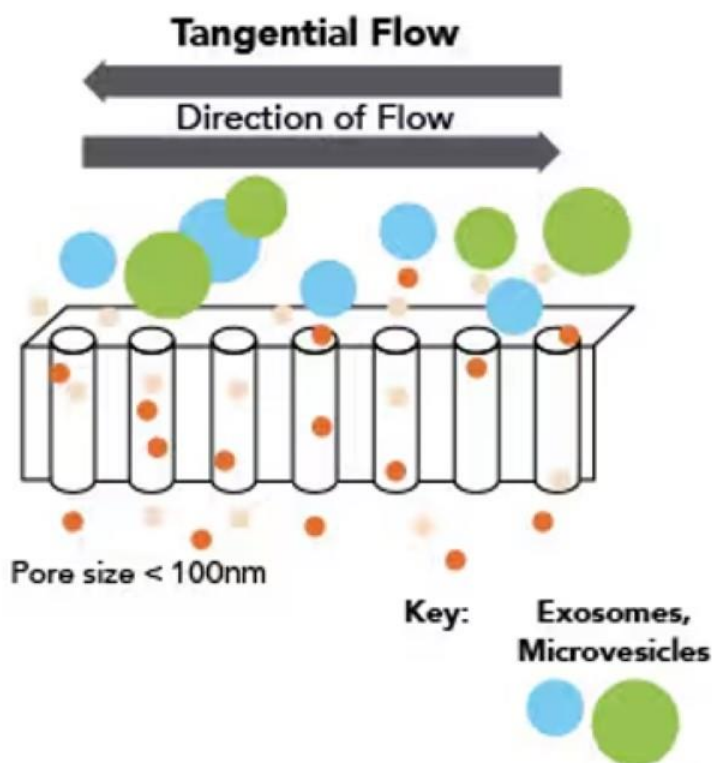
实验室纯化柱



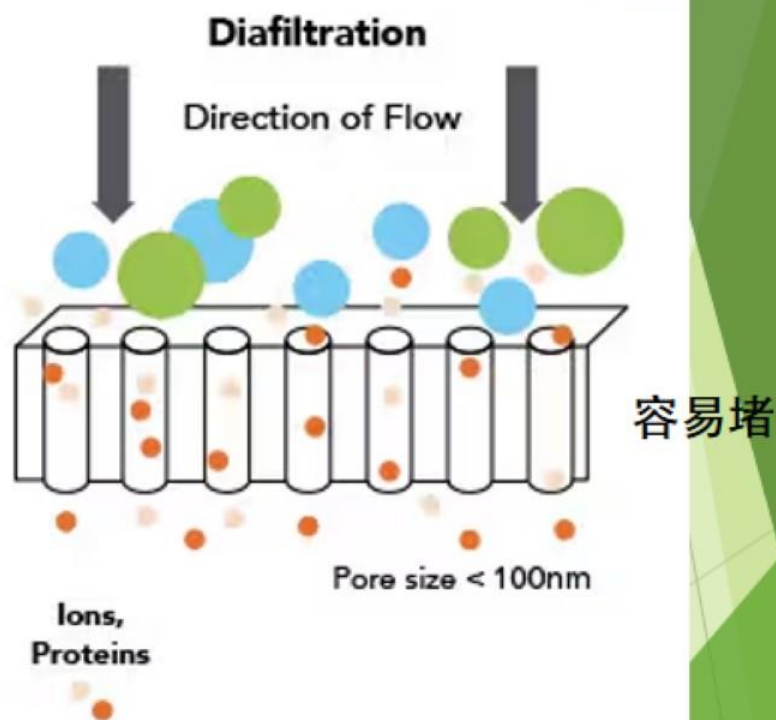
工业柱



切向流超滤

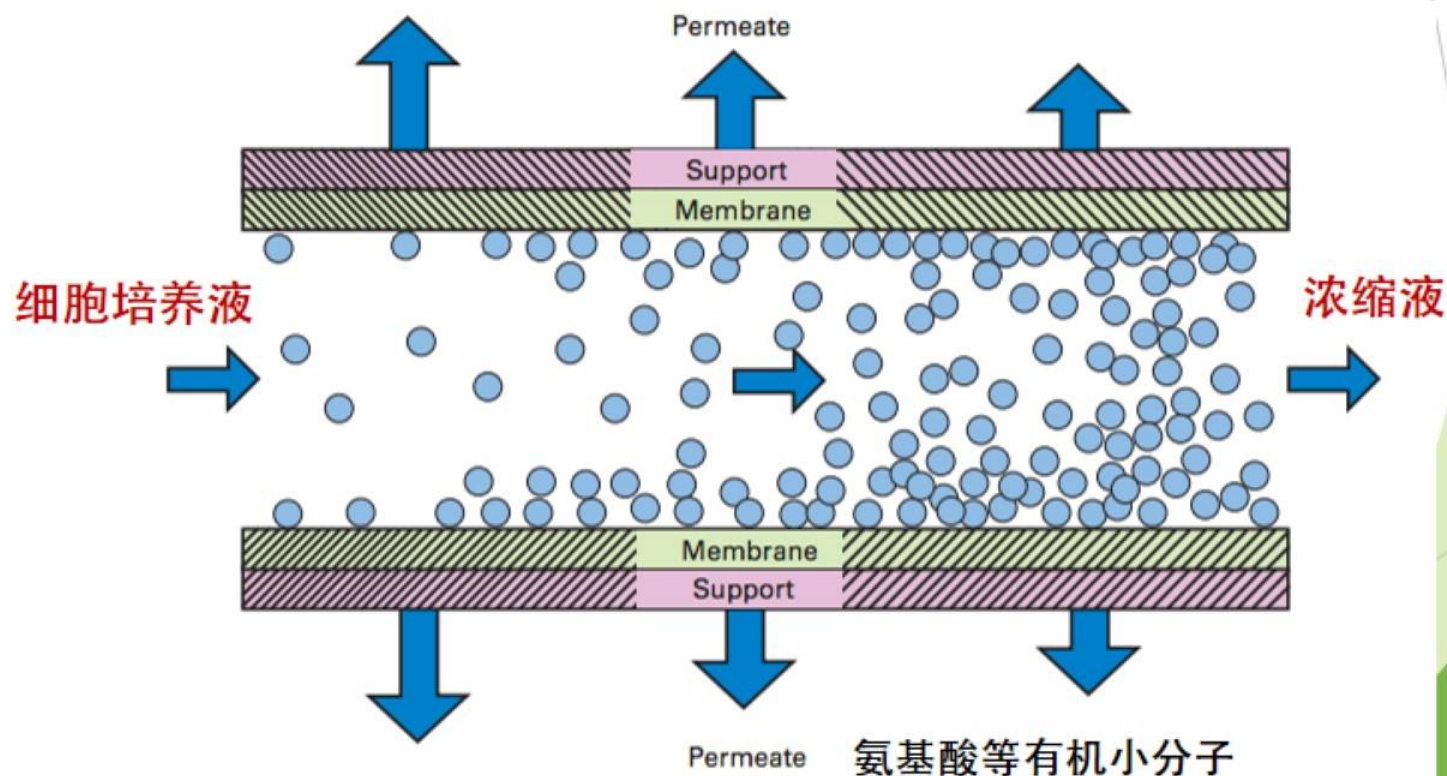


渗滤



切向流超滤浓缩技术

切向流超滤方式与中药材膜分离技术类似，不过一般采用的不是陶瓷膜，而是高分子材料膜包。



生物药浓缩工艺与设备



武汉大学
Wuhan University



赛多利斯的
vivaflow



中药材陶瓷膜超滤



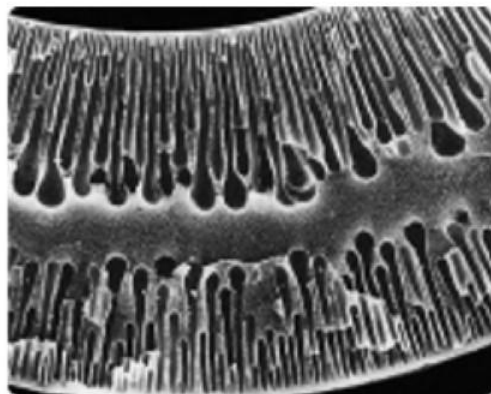
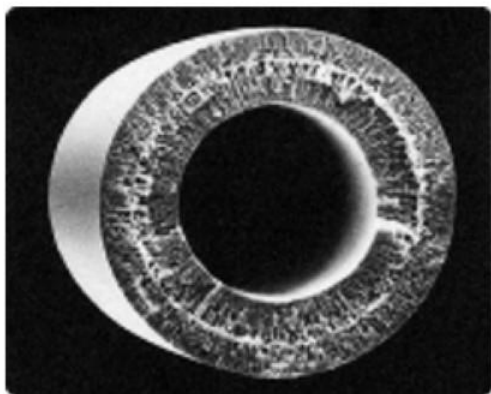
工业级高分子超滤膜

生物药浓缩工艺与设备

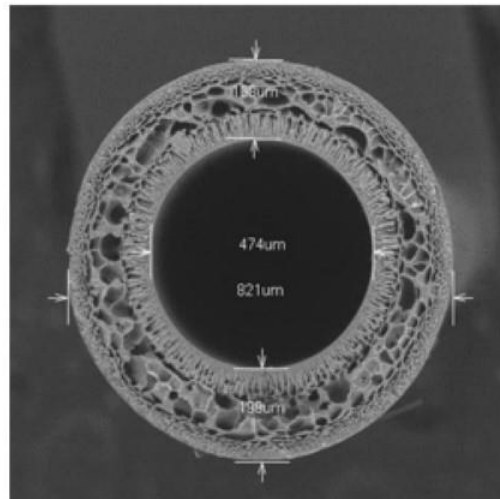
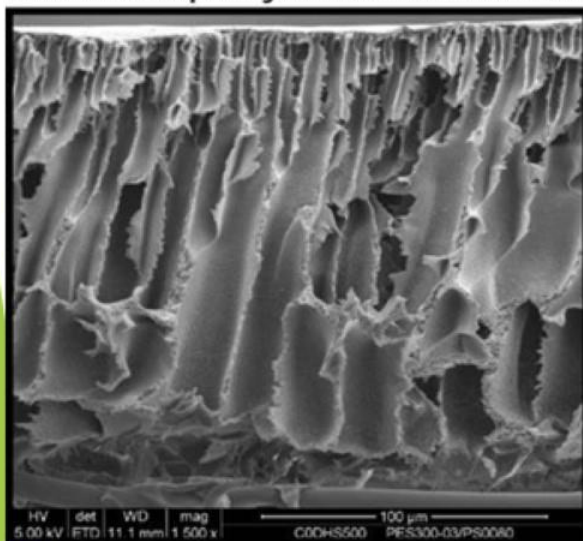


武汉大学
Wuhan University

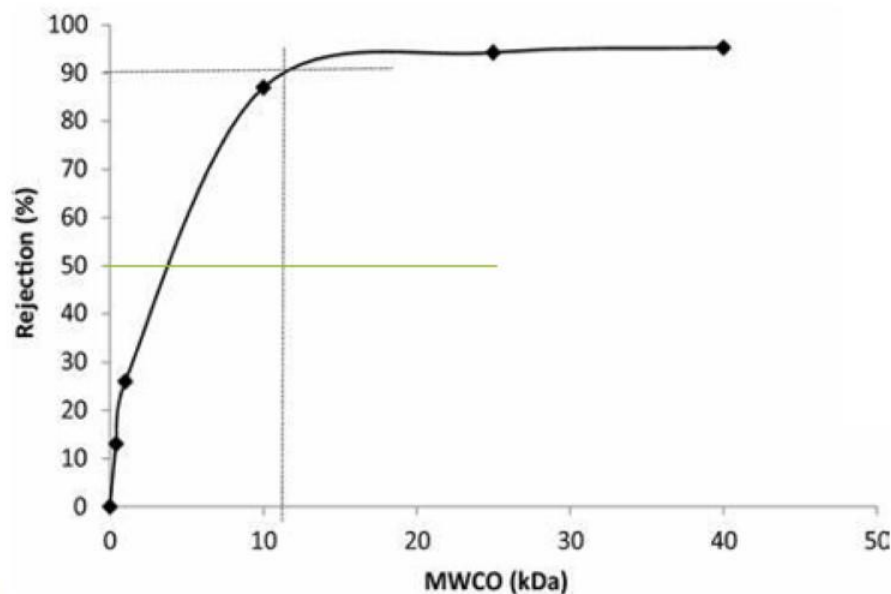
膜材的多孔显微结构



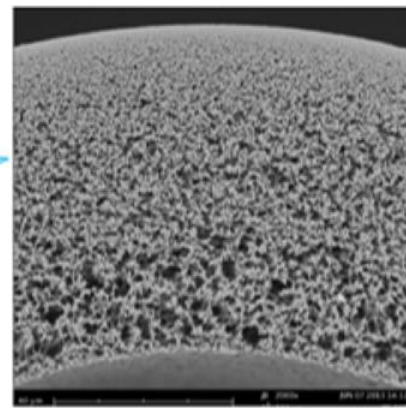
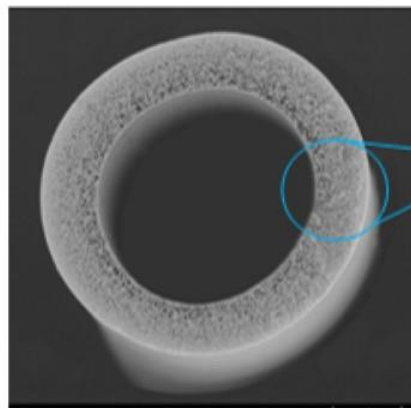
Electron Microscope Image of PES300 Membrane Cross Section



超滤膜的分子量截留曲线



由于工艺技术条件限制，孔洞不能一致，分子量截留并不能做到完美





生物技术药物的质量要求

- ①要求提供关于表达体系的详细资料，以及工程菌（或工程细胞）的特征、纯度（是否污染外来因子）和遗传稳定性等资料
- ②提供培养方法和产量稳定性、纯化方法以及各步中间产品的收率和纯度，除去微量的外来抗原、核酸、病毒或微生物等的方法。

抗体表达过程中的病毒污染问题

- ③要求进行理化鉴定，包括产品的特征、纯度及与天然产品的一致性，如N端15个氨基酸序列、肽图、聚丙烯酰胺凝胶电泳与等电聚焦、高效液相色谱等分析。一般纯度应在95%以上。

生物技术制药工艺过程的质量控制



武汉大学
Wuhan University

- ④ 要求进行外源核酸和抗原检测，规定每剂量DNA含量不超过100pg，细胞培养产品中牛血清含量必须合格。成品中不应含有纯化过程中使用的试剂，包括色谱柱试剂和亲和色谱用的鼠IgG。
- ⑤ 生物活性或效力试验结果应与天然产品进行比较。
- ⑥ 生物技术产品的理化和生物学性质与天然产品完全相同者一般不需重复所有动物毒性试验，与天然产品略有不同者需做较多试验，与天然产品有很大不同者则需做更多试验，包括致癌、致畸和对生育力的影响等。
- ⑦ 所有生物技术产品都必须经过临床试验，以评价其安全性和有效性。

生物技术制药展望



武汉大学
Wuhan University

现代生物技术制药的技术越来越先进，相应的成本也越来越高，已经成为制约生物技术药物广泛应用的障碍。简单并便宜的生物制药技术将是重要发展方向。

农业

vs

生物制药工程



Farmer vs Pharmer



利用烟草生产抗体

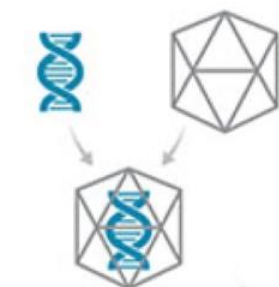
HOW TO
BE A
PHARMER



伊波拉病毒电镜照片



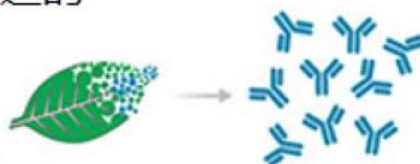
伊波拉病毒的三
联抗体就是用烟
草表达的



将抗体基因嵌
入烟草病毒的
基因组中



用含抗体基因的
病毒感染烟草的
叶片



烟草产生大量抗
体，收获烟草，
提取抗体



病毒感染的烟草叶片

10/17/06/21/Axis-to-make-Humira-biosimilar-in-tobacco-plant-based-bioreactors

Subscribe to our FREE newsletter

Your e-mail address

Subscribe

Brazilian plant to make Humira biosimilar in 'tobacco-based bioreactors'

By Dan Stanton

20 Jun 2017 - Last updated on 21 Jun 2017 at 10:52 GMT



RELATED TAGS: Monoclonal antibodies, Biotechnology

A tobacco plant-based platform could make monoclonal antibodies up to 90% cheaper than mammalian systems, says Axis Biotec which is building a pilot plant in Brazil.

转基因植物生产抗体



武汉大学
Wuhan University

转基因植物生产抗体

6) 大规模种植

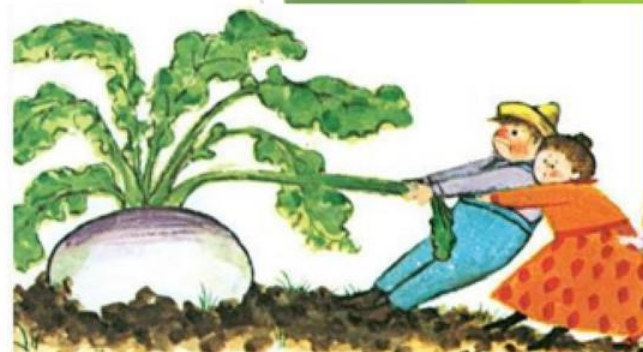
分子克隆

分子克隆
嵌入植物
基因

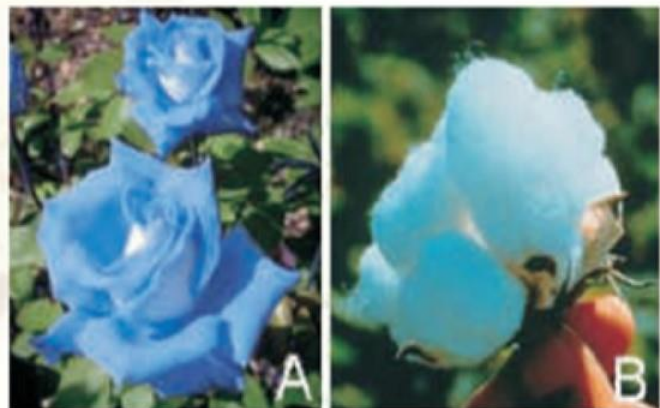
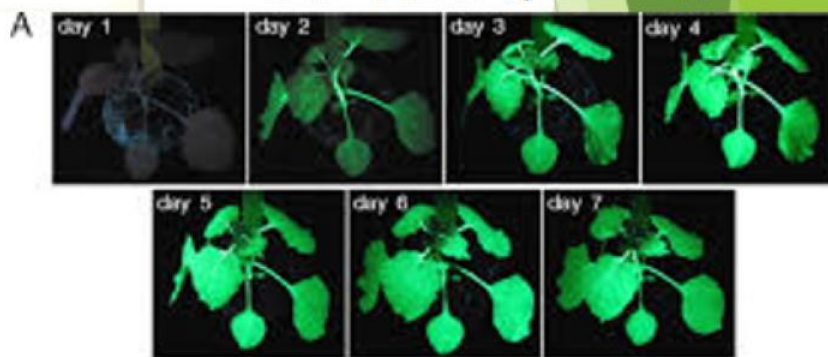
转基因植物制备

2) DNA

DNA 提取

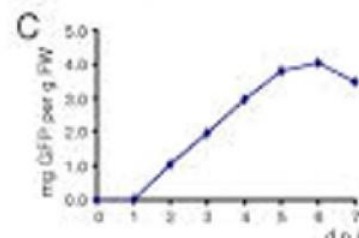
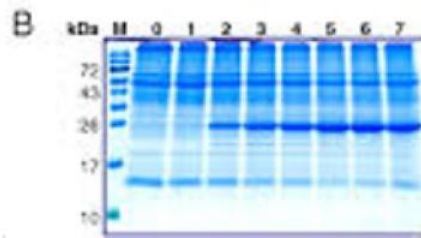


转基因植物制备GFP蛋白

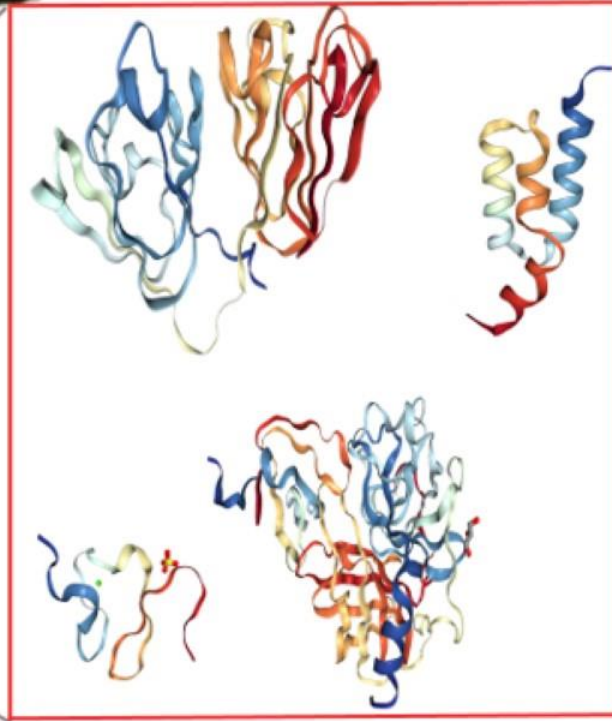
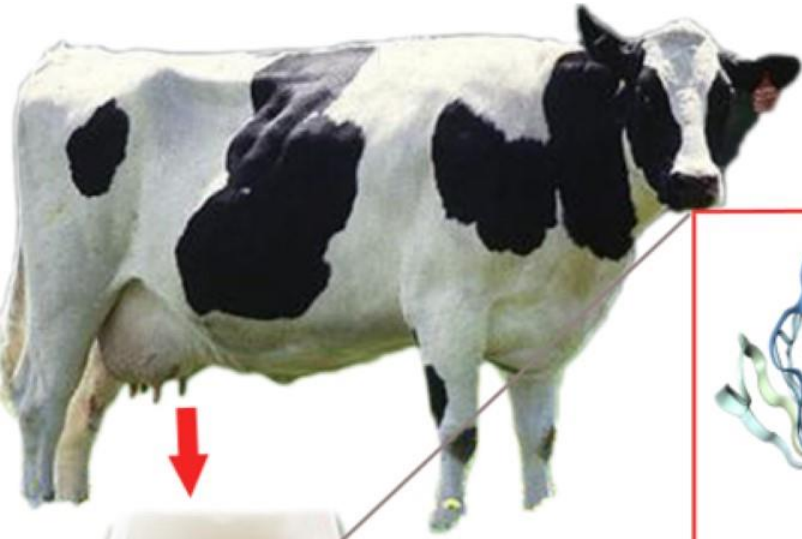


Blue Rose

Blue Colore Cotton



转基因动物生产抗体

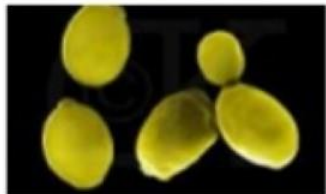


成本优势

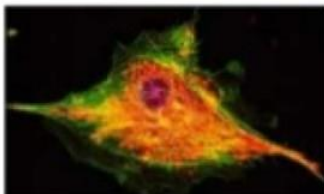


Production costs for antibodies

Production cost	Cost in \$ per gram
Hybridomas	1000
Transgenic animals	100
Transgenic plants	10



E. coli & yeast

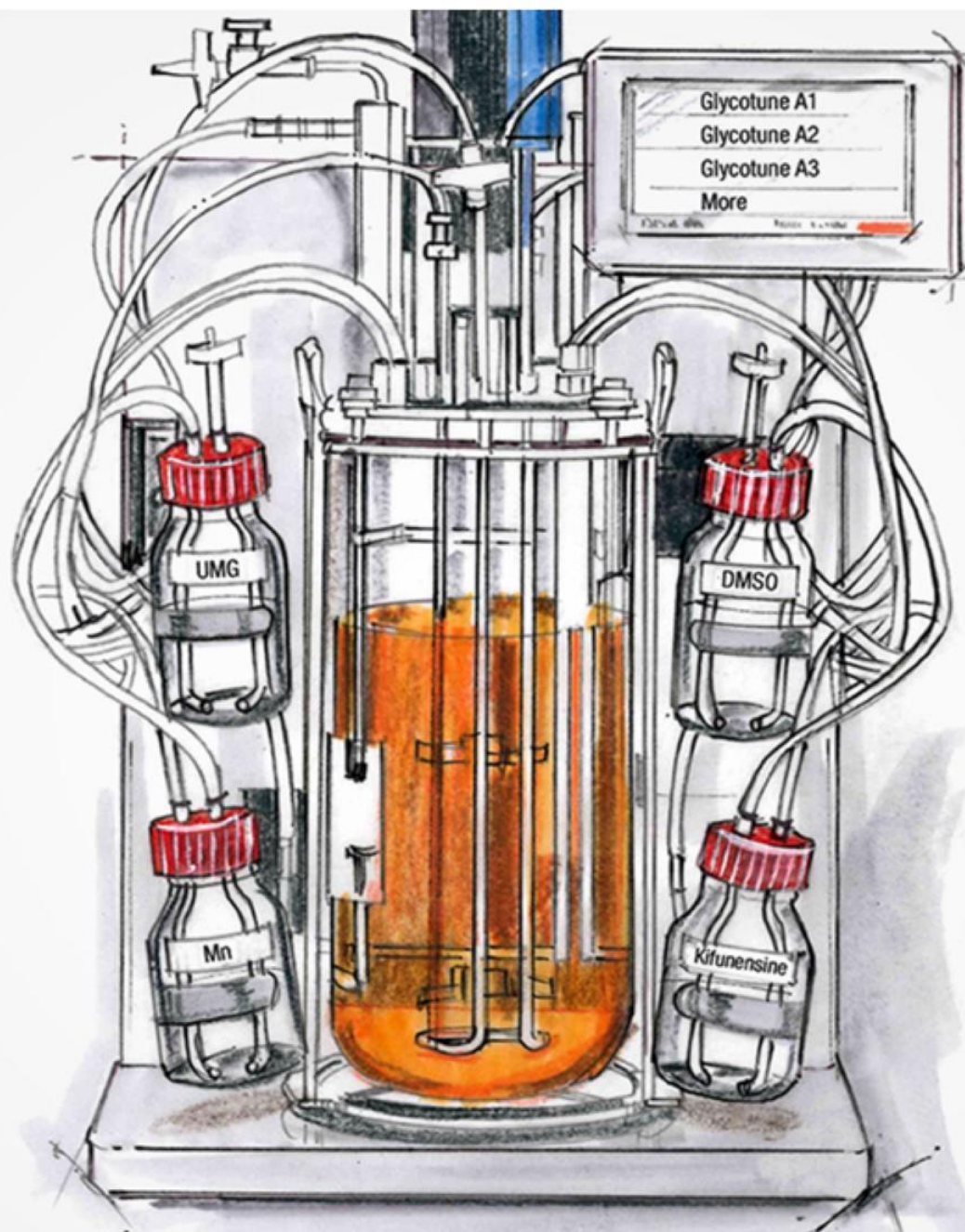


Tr. animals and
animal cells



Transgenic plants

Daniell *et al.*, 2001



Impact of Cell Culture Media Additives on IgG Glycosylation Produced in Chinese Hamster Ovary Cells